# 台灣農業研究

# JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.68 No.3 2019

## Research Articles

195 Effect of Light Intensity on Lip Color in *Oncidesa* Tariflor 'Tainung No. 4 (Snow White)'
*Ching-Hui Chung, Ting-Fang Hsieh, and Ting-En Dai*

202 Studies on Application of Bootstrap Method to Estimate the Crop Cutting Surveys of Rice Grain Yield
*Chih-Hao Chiu and Dah-Jing Liao*

215 Factors of Colchicine Treatments on Polyploidy Induction by Using *in Vitro* Seedlings of *Platycodon grandiflorum*
*Chi-Ni Hsia, Uei-Chern Chen, and Chin-Yi Tsao*

226 Antifungal Effect of Antagonistic Bacteria Isolated from the Froth of Spittlebug *Poophilus costalis* Against Phytopathogenic Fungi
*Shu-Chen Chang, Hsien-Tzung Shih, Jyh-Nong Tsai, Tsung-Chun Lin, and Kuang-Hui Lu*

237 Effects of Mulching on the Seedling Production and Infestation of Sweet Potato Insect Pests in Winter Season of Northern Taiwan
*Shu-Fang Lo and Shou-Horng Huang*

246 Parasitic Behavior of a Potentially Natural Enemy, *Aprostocetus* sp. (Hymenoptera: Eulophidae), on Mango Pest Cecidomyiid *Procontarinia robusta* (Diptera: Cecidomyiidae)
*Sheng-Feng Lin, Shi-Shun Wang, Ang-Shing Lee, Man-Miao Yang, and Hsiou-Hua Hao*

## Short Communication

254 An Efficient Method for the Collection of Coffee Berry Borer [*Hypothenemus hampei* (Ferrari)] Adults
*Tai-Chuan Wang, Zi-Xuan Cheng, and Yu-Ping Liang*

ISSN 0022-4847
9 770022 484003

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

台灣農業研究
JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH
Vol.68 No.3 2019

ISSN 0022-4847
DOI:10.6156/JTAR

台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.68 No.3 2019

## 研究報告

195 光強度對「台農4 號（白雪）」文心蘭唇瓣花色之影響
鍾淨惠、謝廷芳、戴廷恩

202 Bootstrap方法在水稻產量坪割估計應用
邱志浩、廖大經

215 秋水仙素處理離體培養桔梗種子苗誘導多倍體之影響因子研究
夏奇鈮、陳威臣、曹進義

226 由嗜菊短頭脊沫蟬泡沫液中分離之拮抗細菌對植物病原真菌之抑菌效用
張淑貞、石憲宗、蔡志濃、林宗俊、路光暉

237 覆膜處理對台灣北部地區冬季甘藷健康種苗生產及蟲害發生之影響
羅淑芳、黃守宏

246 檬果壯鋏普癭蚋之潛在性天敵寄生蜂*Aprostocetus* sp.（膜翅目：釉小蜂科）寄生行為
林聖豐、王釋玄、李昂勳、楊曼妙、郝秀花

## 研究簡報

254 一個有效率地收集咖啡果小蠹成蟲 [*Hypothenemus hampei* (Ferrari)] 的方法
王泰權、程子軒、梁鈺平

行政院農業委員會農業試驗所出版

# 《台灣農業研究》編審會

**總編輯**

楊純明／農業試驗所作物組

**領域主編 (按筆劃序)**

王強生／國立中興大學農藝學系
王淑珍／國立台灣大學農藝學系
古新梅／國立中興大學農藝學系
安寶貞／農業試驗所植物病理組
吳文哲／國立台灣大學昆蟲學系
呂秀英／苗栗區農業改良場
杜宜殷／國立台灣大學園藝暨景觀學系
沈偉強／國立台灣大學植物病理與微生物學系
林彥蓉／國立台灣大學農藝學系
林慧玲／國立中興大學園藝學系
侯豐男／國立中興大學昆蟲學系
柯俊成／國立台灣大學昆蟲學系
高景輝／國立台灣大學農藝學系
張永和／靜宜大學食品營養系
張瑞璋／農業藥物毒物試驗所
莊愷瑋／國立嘉義大學農藝學系
郭寶錚／國立中興大學農藝學系
陳右人／國立台灣大學園藝暨景觀學系
陳世銘／國立台灣大學生物產業機電工程學系
陳宗禮／國立中興大學農藝學系
陳郁蕙／國立台灣大學農業經濟學系
陳健忠／農業試驗所應用動物組
陳琦玲／農業試驗所農業化學組
曾夢蛟／國立中興大學園藝學系
黃振文／國立中興大學植物病理學系
黃裕銘／國立中興大學土壤環境科學系
黃肇家／農業試驗所作物組
黃鵬林／國立台灣大學園藝暨景觀學系
楊正澤／國立中興大學昆蟲學系
路光暉／國立中興大學昆蟲學系
鄒裕民／國立中興大學土壤環境科學系
劉力瑜／國立台灣大學農藝學系
蔡致榮／農業試驗所
鍾文鑫／國立中興大學植物病理學系
簡立賢／國立中興大學應用經濟學系
顏國欽／國立中興大學食品暨應用生物科技學系

**編輯助理**

王立蓉／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室
王紫瑜／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室

**編輯顧問**

吳宜晏／農業試驗所技術服務組
陳烈夫／農業試驗所技術服務組



# 台灣農業研究

第六十八卷　第三期　　中華民國一〇八年九月三十日

出版者　行政院農業委員會農業試驗所
發行人　林學詩
總編輯　楊純明
地址　41362 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號
網址　http://www.tari.gov.tw
電話　(04)2331-7236
E-mail　jtar@tari.gov.tw
線上投審稿系統　http://www.ipress.tw/J0042

編印　Ainosco Press
地址　23452 新北市永和區成功路一段 80 號 18 樓
電話　(02)2926-6006
E-mail　press@airiti.com

定價　新台幣一七五元
展售門市　1. 國家書店／ 10485 台北市松江路 209 號 1 樓 / 電話 : (02)2518-0207
國家網路書店 http://www.govbooks.com.tw
2. 五南文化廣場／ 40042 台中市中山路 6 號 / 電話 : (04)2226-0330

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 68(3):195–201 (2019)
DOI:10.6156/JTAR.201909_68(3).0001

研究報告

# 光強度對「台農 4 號 (白雪)」文心蘭唇瓣花色之影響

鍾淨惠[1,*] 謝廷芳[2] 戴廷恩[3]

## 摘要

鍾淨惠、謝廷芳、戴廷恩。2019。光強度對「台農 4 號 (白雪)」文心蘭唇瓣花色之影響。台灣農業研究 68(3):195–201。

本研究目的在探討光照強度對「台農 4 號 (白雪)」文心蘭唇瓣花色之影響，評估文心蘭唇瓣在單、雙及三層網等不同遮陰程度 (平均光強度分別為 309.92、191.88 及 69.23 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$) 下的顏色表現與色素含量。結果顯示，在高光強度 (單層遮陰網) 下唇瓣之黃色較深，$b^*$ 值也較高，$L^*$ 值與 $a^*$ 值則不受影響；分析唇瓣中花青素、類黃酮及類胡蘿蔔素等三色素之成分變化，發現僅類胡蘿蔔素之含量會隨光強度減弱而下降。推測影響唇瓣黃色色素表現者為類胡蘿蔔素，降低光強度可使唇瓣類胡蘿蔔素下降，唇瓣花色更趨向白色，故可適度增加遮陰以促進「白雪」文心蘭的轉白效果。

**關鍵詞**：文心蘭、花色、光照、遮陰、類胡蘿蔔素。

## 前言

花朵顏色是花卉作物吸引消費者購買的關鍵因素之一，而花色的呈現大多由花青素與類胡蘿蔔素兩類色素決定，色素種類和組成比例不同所呈現的花色也不同 (Tatsuzawa *et al*. 2010)。花青素儲存於植物液胞，顏色呈現紅色、藍色或紫色；類胡蘿蔔素則存在植物細胞之葉綠體或有色體內，顏色為紅色、黃色或橘色 (To & Wang 2006)。植物色素的表現受環境因子影響，溫度、pH 值或外源添加物的變動會引起植物體內花青素結構或含量變化 (Oren-Shamir *et al*. 2003; Andersen & Jordheim 2006; Burchi *et al*. 2010)。類胡蘿蔔素含量，則容易受光線影響，類胡蘿蔔素的生合成同時受光強度和光質的調控，接收較多光照的「富有」甜柿 (*Diospyros kaki* ‘Fuyu’) 柿果能累積較多類胡蘿蔔素 (Liou 2004)；番茄於貯藏期間照射 UV-C 或紅光，可提高果實類胡蘿蔔素的合成與累積 (Liu *et al*. 2009)。

文心蘭因其花形優美、花色亮麗且花期持久而廣受消費者喜愛，亦是台灣重要的外銷花卉作物。2015 年台灣出口文心蘭金額達 1,152 萬美元，為僅次蝴蝶蘭之第二大外銷蘭科植物 (Council of Agriculture 2016)。文心蘭本為熱帶、亞熱帶的原生蘭花，依原生地環境不同可分別栽種於冷涼、中溫或溫暖的環境 (Tsai *et al*. 2012)。文心蘭育種種原豐富，蜘蛛蘭 (*Brassia*)、齒舌蘭 (*Odontoglassum*)、堇花蘭 (*Miltonia*) 等蘭花屬與文心蘭屬 (*Onicidum*) 演化關係密切、遺傳性狀接近，彼此間可進行屬間雜交，從而衍生出多個新人工雜交屬別 (Lai 2002)，今日許多文心蘭品種即選育自屬間雜交之後代。

文心蘭「台農 4 號 (白雪)」[*Oncidesa* Tariflor ‘Tainung No. 4 (Snow White)’] 為我國第一個自行選育推廣的切花品種，花朵大且具優良切花特性 (Tsai *et al*. 2012)。雖為白花品種，但唇瓣初綻時呈淡黃色，經 3–5 d 後才逐漸轉變為

投稿日期：2018 年 7 月 10 日；接受日期：2019 年 1 月 29 日。
[*] 通訊作者：chchung@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所花卉研究中心助理研究員。台灣 雲林縣。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組研究員兼組長。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所花卉研究中心研究員兼系主任。台灣 雲林縣。

白色。然而實際栽培時卻經常發現唇瓣無法順利轉白的問題，唇瓣呈現淡黃色或黃色，無法達到市場所需之白花要求，造成商品價值低落。為瞭解造成「白雪」文心蘭無法順利轉白的原因，本研究針對不同光強度處理下的唇瓣花色變化進行研究，以確認光照對「白雪」文心蘭唇瓣花色之影響，試驗結果可做為未來調整栽培時遮光條件之參考。

# 材料與方法

## 植物材料與處理

試驗之「白雪」文心蘭植株種植於行政院農委會農業試驗所花卉研究中心 (雲林縣古坑鄉)，採一般網室慣行栽培。試驗設計採用完全逢機設計 (complete randomized design; CRD)，處理分為單層、雙層和三層遮陰網等 3 種光強度 (目前文心蘭切花商業栽培多使用單層或雙層遮陰網)，使用之披覆網為 50% 黑色遮陰網，每處理 12 重複，每重複 3 枝切花。試驗期間為 2014 年 5–6 月，各處理分別以光量子記錄器 (model UA-002-08, Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA) 記錄試驗期間每日 6:30–17:30 之光強度，並將光強度單位轉換為 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$。

## 唇瓣花色調查

花序主莖最頂端的花朵完全開放時進行唇瓣花色調查，為避免取樣花朵顏色尚處於變化期，取頂端算下來第 3 朵以下之花朵進行調查，以 4 朵花之平均色彩參數代表該切花之花色。花色表現以色差儀 NF333 (Nippon Denshoku Industries Co., LTD., Tokyo, Japan) 進行測量，顏色表現以 CIELAB (CIE D65/10° illumination/viewer) 表示：$L^*$ 為顏色亮度，數值範圍為 0 (黑) –100 (白)；$a^*$ 指示顏色在紅色與綠色間的變化，負值趨向綠色，正值趨向紅色；$b^*$ 指示顏色在黃色與藍色間的變化，負值趨向藍色，正值趨向黃色。

## 色素成分與含量測定

唇瓣花色調查完成後，取已調查完畢之切花花朵進行色素成分與含量測定。

花青素與類黃酮含量測定：取切碎混勻之唇瓣組織 0.5 g，加入 1% 鹽酸甲醇後於 4℃ 避光萃取 24 h，過濾、定量，取濾液分別於波長 657、530 及 325 nm 處測定溶液吸光值 (Hitachi U-2000 Spectrophotometer, Hitachi, Tokyo, Japan)，花青素含量計算參照 Rabino & Mancinelli (1986) 所列計算式，類黃酮含量則以 325 nm 處之吸光值表示 (U $g^{-1}$ Fw)。

葉綠素與類胡蘿蔔素含量測定：取切碎混勻之唇瓣組織 0.5 g，加入 80% 丙酮研磨、過濾、定量，於波長 663、646 和 470 nm 處測定溶液吸光值，以 Lichtenthaler & Wellburn (1983) 提出之公式計算葉綠素 a、葉綠素 b 及類胡蘿蔔素含量。

## 統計分析

為確認處理間是否存在差異，針對各唇瓣色彩參數與色素含量進行變異數分析 (analysis of variance; ANOVA)，若處理間有顯著差異 ($P < 0.05$) 則進行最小顯著差異性測驗 (Fisher's least significant difference test; LSD test)。

# 結果

## 唇瓣花色調查

「白雪」唇瓣花色於開放後 3–5 d 逐漸發生變化，考量調查時頂端第 1、第 2 朵花之唇瓣可能仍處於花色變動階段，故取樣花朵為主莖頂端算下來第 3 朵以下的花朵。

單、雙及三層網處理之平均光強度分別為 309.92、191.88 和 69.23 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$。觀察發現「白雪」唇瓣花色隨光強度而變動，遮陰程度越高 (即光強度越低) 花色越接近白色 (圖 1)，$b^*$ 值亦隨光強度降低而下降 (表 1)。變方分析結果顯示不同光強度處理間 $L^*$ 和 $a^*$ 值無顯著差異，$b^*$ 值則呈現顯著差異，表示「白雪」唇瓣之 $b^*$ 值隨光強度不同而產生明顯變化。進一步比較後發現單層網之 $b^*$ 值顯著高於另外兩處理，但雙層網和三層網處理間在統計上則無顯著差異 (表 1)。

## 色素成分與含量測定

三種處理的「白雪」文心蘭唇瓣之 80% 丙

圖 1.　不同光強度處理下之「白雪」文心蘭花朵。由左至右分別為單層網、雙層網和三層網處理。

**Fig. 1.** The flowers of *Oncidesa* Tariflor 'Tainung No. 4 (Snow White)' under different light intensities adjusted by sunshade net. From left to right: single net, double net and triple net. Bar = 1 cm.

表 1.　不同光強度處理之「白雪」文心蘭唇瓣色彩值。

**Table 1.** Color parameters of three light intensity treatments on lips of *Oncidesa* Tariflor 'Tainung No. 4 (Snow White)'.

| Treatment | $L^*$ | $a^*$ | $b^*$ |
|---|---|---|---|
| Single net | 83.48 ± 0.32 a[z] | -3.67 ± 0.28 a | 53.44 ± 1.94 a |
| Double net | 84.33 ± 0.31 a | -4.08 ± 0.25 a | 30.78 ± 2.18 b |
| Triple net | 84.33 ± 0.48 a | -3.69 ± 0.24 a | 26.94 ± 1.86 b |

[z] Mean ± standard error (*n* = 12). Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Fisher's least significant difference test.

酮萃取液，在葉綠素特徵吸收峰附近均無吸收峰，意味著「白雪」唇瓣中不存在葉綠素。類胡蘿蔔素含量則隨光強度減弱而下降 (圖 2A)，單層網、雙層網及三層網含量依次為 40.51 ± 5.51 μg $g^{-1}$ FW、16.30 ± 1.75 μg $g^{-1}$ FW 和 6.52 ± 2.52 μg $g^{-1}$ FW。在 LSD 差異分析的結果，顯示 3 處理間類胡蘿蔔素含量有顯著差異，單層網含量最高，雙層網次之，三層網處理最低，此與唇瓣花色調查之 $b^*$ 值趨勢相似。

類黃酮含量方面，單層網平均含量為 10.60 ± 0.78 U $g^{-1}$ FW；雙層網與三層網平均含量分別為 10.76 ± 0.22 U $g^{-1}$ FW、9.31 ± 0.22 U $g^{-1}$ FW，3 處理之類黃酮含量未達顯著差異 (圖 2B)。單層網下「白雪」文心蘭唇瓣花青素平均含量為 0.42 ± 0.11 μg $g^{-1}$ FW，雙層網處理為 0.13 ± 0.03 μg $g^{-1}$ FW，三層網為 0.36 ± 0.00 μg $g^{-1}$ FW。變方分析結果，顯示單、三層網花青素含量無處理間顯著差異，但上述兩處理之花青素含量則顯著高於雙層網 (圖 2C)。由於類黃酮和花青素含量之統計結果與唇瓣花色表現並無相似趨勢，因此推測光強度高低對「白雪」文心蘭唇瓣內花青素與類黃酮含量多寡並無顯著影響。

## 討論

CIELAB 的色彩參數中，$b^*$ 值的高低反映某一色彩的黃色程度。過去針對花色的研究顯示，黃色、橘色花較紫色或紅色花擁有更高的 $b^*$ 值 (Burchi *et al*. 2010; He *et al*. 2011)。此次試驗就「白雪」文心蘭之唇瓣花色變化進

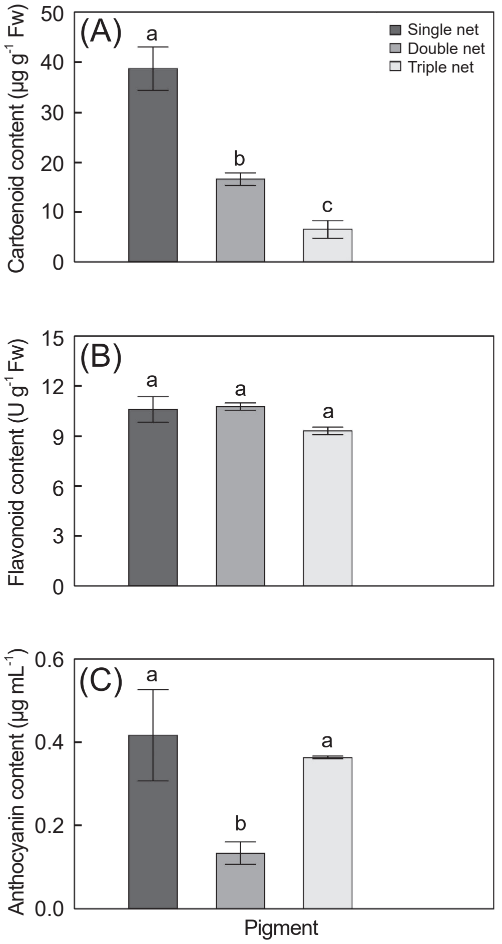


**圖 2.**　各光強度處理之「白雪」文心蘭唇瓣色素含量 (A) 類胡蘿蔔素含量；(B) 類黃酮含量；(C) 花青素含量。誤差線表示平均值的標準差 ($n$ = 4)，字母相同者表示差異未達差異顯著性測驗 (LSD test) 之 5% 顯著水準。

**Fig. 2.**　Pigment contents of lips in *Oncidesa* Tariflor 'Tainung No. 4 (Snow White)' under different light intensities. (A) Carotenoid content. (B) Flavonoid content. (C) Anthocyanin content. Error bar is the standard error of mean ($n$ = 4). Means with the same letter are not significantly different at 5% level by Fisher's least significant difference (LSD) test.

行調查，其花色僅有黃色深淺程度或純白的差別，$b^*$ 值的變化直接反映了花朵黃色著色程度。$a^*$ 值反映的是色彩在綠色與紅色間的變化，因此「白雪」在黃色、白色間的變化並不會對 $a^*$ 值造成影響。前人研究曾指出，黃色花相較紫色、紅色及橘色花有更高的 $L^*$ 值，亦即黃色花的亮度較其他花色為高 (He *et al*. 2011)。3 種光強度處理的「白雪」文心蘭皆有很高的 $L^*$ 值，處理間 $b^*$ 和 $L^*$ 值之變化則顯示光強度雖影響唇瓣的黃色著色程度卻不影響亮度表現。

色素測定結果，發現「白雪」文心蘭唇瓣之類黃酮含量不受光強度處理的影響，不同光強度處理之類黃酮含量均無明顯差別。花青素含量雖有處理間顯著差異，然與處理間的光強度變化並沒有相似的變化。因此，推測花青素含量變化，並非光強度處理造成。過去研究曾指出，文心蘭花朵之紅色部分之組成分為花青素 (Chiou & Yeh 2008)，此次試驗於文心蘭唇瓣亦檢測出花青素存在，推測處理間的花青素變化差異來自「白雪」文心蘭唇瓣背面之紅色斑點多寡。

前人研究曾顯示，文心蘭與其屬間雜交種之唇瓣黃色色素為類胡蘿蔔素 (Hieber *et al*. 2006; Chiou *et al*. 2010; Sakai *et al*. 2010)。本試驗結果顯示，「白雪」文心蘭唇瓣具有類胡蘿蔔素，且其含量隨光強度之降低而下降。此外，唇瓣之黃色程度同樣隨光強度降低而減少，因此推測「白雪」唇瓣著色程度是受類胡蘿蔔素累積量之多寡所影響。在較低的光強度下，「白雪」唇瓣類胡蘿蔔素含量較低，花色更趨近於白色。

光照是影響類胡蘿蔔素形成的主要因素，較高的光強度有利類胡蘿蔔素的累積 (Liou 2004; Li *et al*. 2008)。因光照對類胡蘿蔔素生合成相關酵素或基因有調節作用，光照可提高 IPP 異構酶 (isopentenyl pyrophosphate isomerase) 之活性，促進類胡蘿蔔素前驅物之生合成 (Zhou & Liu 2011)，亦可誘導 *psy* 基因之轉錄 (von Lintig *et al*. 1997)，增進類胡蘿蔔素的合成與累積。

目前「白雪」文心蘭最主要之產地為台中市新社地區，該地區栽培「白雪」文心蘭之網室多採用雙層黑色遮陰網，調查其 5–6 月開花期平均光強度約 234–237 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$，介於本次試驗之單層與雙層遮陰網間，在未進行其他轉色處理情況下唇瓣呈現米黃或淡黃色。試驗

結果發現，「白雪」文心蘭在高光照下唇瓣花色趨向黃色，光強度降低其唇瓣花色則更趨向白色。因此，建議商業栽培應視該地區之光強度適度增加遮陰設備以使唇瓣順利轉白 (如圖 1 之雙層或三層網之唇瓣花色)，以達到市場所需之白花要求。本次試驗僅針對開花期間之栽培環境光強度進行討論，試驗期間除唇瓣花色外未觀察到其他生長勢或花序發育之差異，然前人研究曾指出光強度會影響 *Oncidium* 'Gower Ramsey' 之營養生長和花序品質，光強度提高有利於假球莖充實及提升花序品質，遮陰 75% 以上會嚴重影響生長與開花品質 (Chang & Lee 1998)。因此，未來仍需長期觀察多層遮陰網對「白雪」文心蘭植株生育之影響情況。另外，光線對「白雪」文心蘭的實際調控作用為何，亦有待未來進一步研究。

## 引用文獻


Andersen, Ø. M. and M. Jordheim. 2006. The anthocyanins. p.471–551. *in*: Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. (Andersen, Ø. M. and K. R. Markham, eds.) CRC Press. Boca Raton, FL. 1256 pp.

Burchi, G., D. Prisa, A. Ballarin, and P. Menesatti. 2010. Improvement of flower color by means of leaf treatments in lily. Sci. Hortic. 125:456–460.

Chang, Y. C. and N. Lee. 1998. Effect of light level on pseudobulb growth and flowering quality of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. J. Ilan Inst. Technol. 1:39–51. (in Chinese with English abstract)

Chiou, C. Y. and K. W. Yeh. 2008. Differential expression of *MYB* gene (*OgMYB1*) determines color patterning in floral tissue of *Oncidium* Gower Ramsey. Plant Mol. Biol. 66:379–388.

Chiou, C. Y., H. A. Pan, Y. N. Chuang, and K. W. Yeh. 2010. Differential expression of carotenoid-related genes determines diversified carotenoid coloration in floral tissues of *Oncidium* cultivars. Planta 232: 937–948.

Council of Agriculture. 2016. Agricultural Trade Statistics of the Republic of China 2015. Council of Agriculture, Executive Yuan. Taipei, Taiwan. 127 pp. (in Chinese)

He, Q., Y. Shen, M. Wang, M. Huang, R. Yang, S. Zhu, L. Wang, Y. Xu, and R. Wu. 2011. Natural variation in petal color in *Lycoris longituba* revealed by anthocyanin components. PLOS ONE 6:e22098. doi:10.1371/journal.pone.0022098

Hieber, A. D., R. G. Mudalige-Jayawickrama, and A. R. Kuehnle. 2006. Color genes in the orchid *Oncidium* Gower Ramsey: Identification, expression, and potential genetic instability in an interspecific cross. Planta 223:521–531.

Lai, P. C. 2002. The introduction of *Oncidium, Brassia, Miltonia*, and *Odotoglossum* and their alliance. p.86–133. *in*: Oncidium Monograph. (Lee, N., ed.) Taiwan Floricult. Dev. Assn. Taipei, Taiwan. 269 pp. (in Chinese)

Li, X. K., Y. L. Zhu, Y. T. Ning, and J. L. Su. 2008. The effects of applying nutrient solution on leaf color of *Populus × euramericana* 'Zhonghong' under various sunlights. Acta Agric. Shanghai 24:20–24. (in Chinese with English abstract)

Lichtenthaler, H. K. and A. R. Wellburn. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Biochem. Soc. Trans. 11:591–592.

Liou, Y. T. 2004. Improving 'Fuyu' persimmon fruit coloration by field management. p.81–105. *in*: Proceeding of Symposium on Cultural Techniques and Management in Non-Astringent Persimmon. September 29–30, 2004. Taichung, Taiwan. Taichung DARES. Taichung, Taiwan. (in Chinese with English abstract)

Liu, L. H., D. Zabaras, L. E. Bennett, P. Aguas, and B. W. Woonton. 2009. Effect of UV-C, red light and sun light on the carotenoid content and physical qualities of tomatoes during post-harvest storage. Food Chem. 115:495–500.

Oren-Shamir, M., A. Nissim-Levi, R. Ovadia, S. Kagan, and L. Shaked-Sachray. 2003. Increased anthocyanin accumulation in flowers and foliage at elevated temperatures is affected by magnesium treatment. Acta Hortic. 624:171–176.

Rabino, I. and A. L. Mancinelli. 1986. Light, temperature, and anthocyanin production. Plant Physiol. 81:922–924.

Sakai, W. S., E. Band, J. Edwards, and R. Shioshita. 2010. A preliminary study of the effect of ultraviolet radiation on visible flower coloration in two orchids. Acta Hortic. 878:367–371.

Tatsuzawa, F., K. Ichihara, K. Shinoda, and K. Miyoshi. 2010. Flower colours and pigments in *Disa* hybrid (Orchidaceae). S. Afr. J. Bot. 76:49–53.

To, K. Y. and C. K. Wang. 2006. Molecular breeding of flower color. p.300–310. *in*: Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues (Volume I). (da Silva, J. A. T., ed.) Global Science Books. London, UK. 645 pp.

Tsai, T. M., K. C. Chuang, and T. F. Hsieh. 2012. Developing new *Oncidium* varieties. p.51–60. *in*: Proceeding of Symposium on Achievements of Floriculture Research Team of Council of Agriculture in 2011. December 9, 2011. Tainan, Taiwan. TARI, Taichung, Taiwan. (in Chinese with English abstract)

von Lintig, J., R. Welsch, M. Bonk, G. Giuliano, A. Batschauer, and H. Kleinig. 1997. Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. Plant J. 12:625–634.

Zhou, L. and L. Liu. 2011. Regulation factors of carotenoid biosynthesis and their impacts on photosynthesis. Tianjin Agric. Sci. 17(5):5–8. (in Chinese with English abstract)

# Effect of Light Intensity on Lip Color in *Oncidesa* Tariflor 'Tainung No. 4 (Snow White)'

Ching-Hui Chung[1,*], Ting-Fang Hsieh[2], and Ting-En Dai[3]

## Abstract

Chung, C. H., T. F. Hsieh, and T. E. Dai. 2019. Effect of light intensity on lip color in *Oncidesa* Tariflor 'Tainung No. 4 (Snow White)'. J. Taiwan Agric. Res. 68(3):195–201.

This research was aimed at studying how the light intensity influences the lip color of *Oncidesa* Tariflor 'Tainung No. 4 (Snow White)'. Plants were grown under three different shading levels (light intensities are 309.92, 191.88 and 69.23 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$, respectively) during flowering season, and their lip color and pigments contents were evaluated after flowering. Flowers that opened under higher light intensity had higher $b^*$ value, but $L^*$ and $a^*$ value were not affected by light intensity. The pigments contents included anthocyanin, flavonoid and carotenoid in lips of three treated flowers were analyzed. Data showed that only carotenoid content was decreased with decreasing light intensity. It was speculated that the yellow pigment of lip is carotenoid. The results pointed out that reducing light intensity could lower the carotenoid content of lip and whiten the floral color of 'Snow White'.

**Key words:** Oncidium, Flower color, Light, Shading, Carotenoid.

Received: July 10, 2018; Accepted: January 29, 2019.

[*] Corresponding author, e-mail: chchung@tari.gov.tw

[1] Assistant Research Fellow, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Yunlin, Taiwan, ROC.

[2] Research Fellow and Director, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Taichung, Taiwan, ROC.

[3] Research Fellow and Department Head, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Yunlin, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 68(3):202–214 (2019)
DOI:10.6156/JTAR.201909_68(3).0002

研究報告

# Bootstrap 方法在水稻產量坪割估計應用

邱志浩[1]　廖大經[2,*]

## 摘要

邱志浩、廖大經。2019。Bootstrap 方法在水稻產量坪割估計應用。台灣農業研究 68(3):202–214。

本研究以 2017 年行政院農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所之溪口農場水稻坪割估計產量資料為例，利用蒙地卡羅模擬取樣探討 bootstrap 估計法分別在母體分布及樣本數不同的條件下，其點估計與區間估計的表現，並與傳統參數估計法做比較。研究結果顯示，無論以母體分布為常態或有偏分布，樣本數為小樣本 ($n$ < 30) 或大樣本，bootstrap 與傳統參數估計法在點估計的表現幾乎相同。由於 bootstrap 估計法於估計過程中並未增加新的樣本訊息，因此對於點估計精確度的提升助益不大。在區間估計方面，比較傳統參數估計法、bootstrap normal (BN)、bootstrap percentile (BP) 及 bootstrap-$t$ (B$t$) 等 4 種區間估計法在 0.95 的信賴係數下的估計表現。在任何母體分布及樣本數條件下，B$t$ 估計法之覆蓋機率均達到 0.95 或以上的水準，而 BN 及 BP 估計法僅在母體為常態分布，樣本數 $n$ = 100 時之覆蓋機率始接近 0.95。區間寬度期望值則恆以 BN 及 BP 估計法為最窄，B$t$ 估計法為最寬。實際上在固定之信賴係數下，覆蓋機率與區間寬度兩者之間常出現此消彼長的現象。本研究顯示在各種母體分布或樣本數之變化下，無論覆蓋機率或區間寬度均以 bootstrap 估計法的表現較佳，說明基於 bootstrap 原理的估計法對於區間估計精確度表現具有相當的穩健性。

**關鍵詞**：水稻、坪割、bootstrap 估計、蒙地卡羅模擬。

## 前言

水稻為台灣主要糧食作物，據官方統計資料顯示，2016 年台灣水稻一期稻作之耕作面積為 168,871 ha，占當年度總耕作面積之 22.65% (Council of Agriculture 2016)。基此，水稻產量調查為農業統計之重要項目，舉凡政府公糧收購、產業輔導、國際貿易及農業保險理賠標準，乃至於國家糧食生產與糧食安全等農糧政策之擬定，均須以水稻產量資料為基礎，據此，農政機關特訂定相關辦法，以供執行產量調查。

坪割調查法 (crop cutting surveys; CCS) 是目前世界上普遍使用之水稻產量調查方式，有關 CCS 的抽樣理論及方法，主要在 20 世紀前半葉由印度統計學者所發展 (Mahalanobis 1944, 1946; Hubback 1946)。台灣現行坪割調查方式，主要係依據農糧署所訂定之「台灣地區稻米單位產量調查作業須知」，採取「百株割」坪割方法，即每樣本田設置 4 個基準點，以基準點為中心割取左右上下共 5 行 5 株範圍內共計 25 株稻株，因此每樣本田總計割取 100 株樣本稻株。坪割樣本稻株經脫粒調製後，獲得 100 株之穀粒重量，再依樣本田行株距換算得到每公頃稻穀產量。

上述估計方法係以點估計 (point estimation) 方式，由坪割樣本求得樣本平均值，並由該樣本估值來推估該田區之單位產量 (即母體參數)。但是，由於抽樣誤差的影響，樣本估值恰好等於母體參數的可能性相當小，而且抽樣誤差大小亦無從獲知，對於母體參數

投稿日期：2018 年 10 月 22 日；接受日期：2019 年 2 月 22 日。
* 通訊作者：djliao@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系助理研究員。台灣 嘉義市。
[2] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系副研究員。台灣 嘉義市。

所提供的資訊及做為決策的參考價值助益有限。因此，進一步根據母體參數之樣本估值及其抽樣分布，建立一個信賴機率 (confidence probability) 保證覆蓋母體參數的區間，稱之為信賴區間 (confidence interval)。然而，在實務上有時因為樣本取得困難或抽樣成本太高，以致無法獲得足以提供正確判斷抽樣分布的樣本數。在信賴機率不變的條件下，樣本數減少將影響信賴區間的精確度。為了解決傳統參數統計關於抽樣分布及樣本數的限制，遂有學者以現有的樣本資料建構關於樣本的經驗分布函數 (empirical distribution function; e.d.f.) 來類比 (plug-in) 母體的機率分布，再利用重複取樣 (resampling) 方式從經驗機率分布中抽取樣本，組成重複取樣樣本並估計樣本參數的概念，發展出 jackknife 估計法 (Quenouille 1949, 1956; Tukey 1958) 及 bootstrap 估計法 (Efron 1979) 等非參數統計方法。jackknife 估計法係針對現有樣本，將樣本分為數個彼此互斥的子集，藉由每次刪除 1 個樣本子集後計算剩餘樣本子集的估值，如此窮盡估計刪除後的樣本子集估值，可獲得 1 組虛擬樣本估值 (pseudovalue)，再以此求得 jackknife 估值。jackknife 估計法的優點在於藉由重複取樣可減少估值偏差，其區間估計亦較為穩健 (robust) (Miller 1974)；其缺點為不適用於非線性統計量，例如估計中位數之標準機差 (Efron 1979)。bootstrap 估計法同樣以現有樣本建構經驗分布函數，再從經驗分布函數中以歸還方式進行重複取樣，獲得 1 組與原樣本大小相同的 bootstrap 樣本，並根據已知平均值或標準機差等統計量的計算公式，由 bootstrap 樣本估計獲得 bootstrap 統計量。若以如此歸還重複取樣的方式進行 $B$ 次，則獲得 $B$ 組之 bootstrap 樣本，以及 $B$ 組之 bootstrap 統計量。依據 plug-in 原則，由 1 組原始樣本產生 $B$ 組之 bootstrap 統計量的機率分布，可類比於該統計量由母體連續抽樣之抽樣分布，如此即使在母體分布未知的情況下，亦可對於統計量進行估計。

本研究之目的在於以行政院農業委員會農業試驗所嘉義農業試驗分所 (以下簡稱本分所) 溪口農場之水稻坪割及實際產量資料為例，比較傳統參數估計法 (以下簡稱傳統估計法) 及 bootstrap 估計法對於產量估計之表現，期望藉由探索穩健適當的統計方法提高產量估計的精確度，進而對於農糧政策擬定及稻作產業發展提供可靠的參考依據。

# 材料與方法

## 田區設計及栽培管理

本研究為配合執行行政院農業委員會科技計畫「農業生態系長期生態研究與應用」，乃於 2017 年第 1 期作規劃本分所溪口農場田區 (經度 120°24’16”E，緯度 23°34’56”N，海拔 17 m) 設計長邊為東西向，寬邊為南北向，總面積為 7.29 ha。農路將田區分割為南北兩大區，而北大區又劃分為北 1 及北 2 兩區，其中北 1–1 與北 1–2 區分別為水田連作慣行及永續區，北 1–3、北 2–2 及北 2–3 區為水旱輪作慣行區，北 1–4、北 2–1 及北 2–4 區為水旱輪作永續區；另於北 2 區設水旱輪作對照田區一處，小區合計面積為 3.77 ha。南大區又劃分為南 3 及南 4 兩區，其中南 3–1、南 4–1 及南 4–2 區為水田連作慣行區，南 3–2、南 3–3 及南 4–3 為水田連作永續區；另於南 3 區設水田連作對照田區一處，小區合計面積為 3.52 ha。試驗採多本植，行株距 0.30 m × 0.18 m，施肥、水分及病蟲害防治管理依計畫施行。施肥方式在慣行及永續田區之氮肥施用量分別為 180 kg $ha^{-1}$ 及 100 kg $ha^{-1}$，分為基肥、第 1 次追肥、第 2 次追肥及穗肥等 4 次施用，每次施用量分別為 45 kg $ha^{-1}$ 及 25 kg $ha^{-1}$。水分管理方式在秧苗成活期至最高分蘗期田區維持水深 3–5 cm，最高分蘗期至幼穗形成期進行排水曬田，幼穗形成期至抽穗期維持水深 5–10 cm，成熟期則以水深 3–5 cm 進行輪灌，收穫前 5–7 d 斷水。病蟲害防治以 10% 撲殺培丹 (Probenazole + cartap hydrochloride) 粒劑防治稻熱病、白葉枯病、二化螟及瘤野螟，用量為 30 kg $ha^{-1}$；另以 1.5% 福拉比 (Furametpyr) 粒劑防治紋枯病，用量為 20 kg $ha^{-1}$。

### 坪割基準點決定及割取方式

每小區設 5 點產量坪割基準點 (即取樣單位)，以小區寬邊距離之 1/2 處做為前進基準點，由該點前進 15 m 處設置第 1 坪割基準點；由第 1 坪割基準點左行 10 m 後再前進 15 m 處設置第 2 坪割基準點；由第 2 坪割基準點右行 10 m 後再前進 15 m 處設置第 3 坪割基準點；由第 3 坪割基準點前進 15 m 後再右行 10 m 處設置第 4 坪割基準點；由第 4 坪割基準點前進 15 m 後再左行 10 m 處設置第 5 坪割基準點。割取方式為百株割，即以每坪割基準點為中心割取 10 行 × 10 株水稻植株，總計 100 株。

### 坪割稻穀調製及單位面積產量估計

坪割稻株進行脫粒後，穀粒裝入網袋中以日曬方式進行乾燥至含水量 14–15% 後稱取重量，所得重量除以 100 後即單株穀粒重量，該單株穀粒重量乘以 185,704 (即每公頃種植稻株數，行株距以 0.30 m × 0.18 m 計算) 換算得每公頃稻穀產量。

### 統計分析

本研究利用 2017 年第 1 期作本分所溪口農場北區及南區之水稻坪割資料，分別以假設母體分布已知之傳統估計法及 bootstrap 估計法進行單位面積產量之點估計及信賴區間估計之比較。其中，bootstrap 估計信賴區間使用 3 種估計方法，分別是常態近似法 (bootstrap normal; BN) (Efron & Tibshirani 1986)、百分位法 (bootstrap percentile; BP) 及 bootstrap-*t* 法 (B*t*) (Efron 1981)。另外，以農場南北兩區坪割資料為基礎，利用蒙地卡羅方法 (Monte Carlo method) 模擬在大量簡單隨機取樣情況下，比較不同估計方法在不同樣本數及母體機率分布的條件下其估計表現優劣。分析參數設定如下：bootstrap replications 次數 $B$ 設定為 1,000 次 (Efron & Tibshirani 1986)；蒙地卡羅模擬次數 $M$ 設定為 100,000 次；樣本數設定為 $n$ = 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 及 100 等 11 種大小，目的在於探討各估計法在小樣本 ($n$ < 30) 及大樣本之條件下的估計表現。模擬母體機率分布設定為常態分布及實際有偏分布等兩種情況，其中常態分布分別設定參數為北區坪割資料 (平均值 9,182.69、標準差 2,317.61) 及南區坪割資料 (平均值 8,098.01、標準差 1,487.34)。另外，為了模擬坪割資料的實際機率分布之偏度及峰度，利用 Johnson 分布 (Johnson 1949) 可包含機率分布所有偏度及峰度組合的特性，先將坪割資料轉換配適為偏度及峰度最接近坪割資料之 Johnson 分布，再由該配適之 Johnson 分布中模擬簡單隨機抽樣過程產生樣本進行比較各種估計法之表現。

點估計評估指標為平均絕對偏差 (mean absolute bias error; MABE) 及誤差均方根 (root mean square error; RMSE)；區間估計則以覆蓋機率 (coverage probability; CP) 及區間期望長度 (expected length; EL) 做為評價標準。以下詳述傳統估計法及 bootstrap 估計法對於點估計及區間估計使用之方法。

### 傳統估計法

**點估計：**以最大概度法 (maximum likelihood method) 推導參數估式，假設母體 $X$ 為常態分布 $N(\mu, \sigma)$，由母體中隨機抽取樣本數為 $n$ 的一組樣本 $X_1, X_2, ..., X_n$，則概度函數為

$$L(\theta) = \prod_{i=1}^{n} f(X_i;\theta). \tag{1}$$

令 $L$ 關於參數 θ 的偏微分等於 0，即

$$\frac{\partial}{\partial\theta} L(\theta) = 0. \tag{2}$$

解 (2)，得 θ 之估式 $\hat{\theta}$，若將 $\hat{\theta}$ 代入 (3)

$$\frac{\partial^2}{\partial\theta^2} L(\theta) < 0. \tag{3}$$

關係式成立，則 $\hat{\theta}$ 稱為參數 θ 的最大概度估式 (maximum likelihood estimator; MLE)。本研究假設母體 $X$ 為常態分布 $N(\mu, \sigma)$，根據最大概度法推導其母體平均值 μ 的 MLE 為樣本平均估式 $\overline{X}$，即

$$\hat{\mu} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} X_i = \overline{X}. \tag{4}$$

**區間估計：**以樞紐量 (pivotal quantity) 對於母體參數進行區間估計，假設母體 $X$ 為常態分布 $N(\mu, \sigma)$，由母體中隨機抽取樣本數為 $n$ 的一組樣本 $X_1, X_2, \ldots, X_n$。根據 (4) 式已知 $\mu$ 的 MLE 等於 $\bar{X}$，則 $\bar{X}$ 的取樣分布為 $N(\mu, \frac{\sigma^2}{n})$。若 $\sigma$ 已知，則樞紐量為

$$Z = \frac{\bar{X} - \mu}{\sigma/\sqrt{n}} \rightarrow N(0,1). \quad (5)$$

設定信賴係數為 $1 - \alpha$，則

$$-Z_{\alpha/2} < \frac{\bar{X} - \mu}{\sigma/\sqrt{n}} < Z_{\alpha/2}. \quad (6)$$

母體平均值 $\mu$ 的信賴區間為

$$\bar{X} - Z_{\alpha/2}\frac{\sigma}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{X} + Z_{\alpha/2}\frac{\sigma}{\sqrt{n}}. \quad (7)$$

若 $\sigma$ 未知，則樞紐量為

$$t = \frac{\bar{X} - \mu}{S/\sqrt{n}} \rightarrow t_{n-1}. \quad (8)$$

(8) 式中 $t_{n-1}$ 表示自由度為 $n - 1$ 的 $t$ 分布。設定信賴係數為 $1 - \alpha$，則

$$-t_{[\alpha/(2,n-1)]} < \frac{\bar{X} - \mu}{S/\sqrt{n-1}} < t_{[\alpha/(2,n-1)]}. \quad (9)$$

母體平均值 $\mu$ 的信賴區間為

$$\bar{X} - t_{[(\alpha/(2,n-1)]}\frac{S}{\sqrt{n-1}} < \mu < \bar{X} + t_{[(\alpha/(2,n-1)]}\frac{S}{\sqrt{n-1}}. \quad (10)$$

## bootstrap 估計法

**原理：**假設有未知機率分布母體 $F$，其待估參數為 $\theta = t(F)$ (本研究中 $\theta$ 為母體平均值 $\mu$)，則其 plug-in 估計式為 $\hat{\theta} = t(\hat{F})$。自 $F$ 中抽取一組樣本數為 $n$ 的樣本 $\mathbf{x} = (x_1, x_2, \ldots, x_n)$，將 $1/n$ 的機率配置於每個樣本點 $x_1, x_2, \ldots, x_n$，如此可根據樣本建構一個經驗分布函數 $\hat{F}$。再從樣本 $\mathbf{x}$ 中進行一次簡單隨機歸還取樣，獲得一組樣本數為 $n$ 的 bootstrap 樣本 $\mathbf{x}_b^* = (x_1^*, x_2^*, \ldots, x_n^*)$ 及計算 $\theta$ 之 bootstrap replication $\hat{\theta}_b^* = s(\mathbf{x}_b^*)$，如此稱為一次 bootstrap 過程。若重複進行 bootstrap 過程 $B$ 次，可獲得 bootstrap 樣本 $\mathbb{x}^* = (\mathbf{x}_1^*, \mathbf{x}_2^*, \ldots, \mathbf{x}_B^*)$ 及 bootstrap replications $\hat{\boldsymbol{\theta}}^* = (\hat{\theta}_1^*, \hat{\theta}_2^*, \ldots, \hat{\theta}_B^*)$，為足以估計 $\hat{\theta}$ 之標準誤差 (standard error; se) 及信賴區間。再將 $1/B$ 的機率配置於每個 bootstrap replications $\hat{\theta}_1^*, \hat{\theta}_2^*, \ldots, \hat{\theta}_B^*$，則可建構關於 $\hat{\theta}$ 之 bootstrap 估計取樣分布。

**點估計：**令 $\hat{\theta} = s(\mathbf{x})$ 為母體平均值 $\mu$ 的樣本估值 $\bar{x}$，則 $\hat{\theta}$ 之近似 bootstrap 期望值 $E_{\hat{F}}(\hat{\theta}_b^*)$ 為

$$\hat{\theta}_{(\cdot)}^* = \sum_{b=1}^{B} \hat{\theta}_b^*/B. \quad (11)$$

**區間估計：**(1) 常態近似法 (BN)：假設有未知機率分布母體 $F$，其待估參數為 $\theta = t(F)$ (在本研究中 $\theta$ 為母體平均值 $\mu$)，則其 plug-in 估計式為 $\hat{\theta} = t(\hat{F})$。自 $F$ 抽取一組樣本數為 $n$ 的樣本 $\mathbf{x} = (x_1, x_2, \ldots, x_n)$，首先根據樣本 $\mathbf{x}$ 估計 $\theta$ 得到統計量 $\hat{\theta} = s(\mathbf{x})$，其次以樣本 $\mathbf{x}$ 重複進行 bootstrap 過程 $B$ 次，可獲得 $B$ 組 bootstrap 樣本 $\mathbb{x}^* = (\mathbf{x}_1^*, \mathbf{x}_2^*, \ldots, \mathbf{x}_B^*)$。由 $\mathbb{x}^*$ 計算 $\hat{\theta}_b^* = s(\mathbf{x}_b^*)$ 獲得 $B$ 個 bootstrap replications $\hat{\boldsymbol{\theta}}^* = (\hat{\theta}_1^*, \hat{\theta}_2^*, \ldots, \hat{\theta}_B^*)$ 並估計 $\hat{\theta}$ 的標準誤差

$$\hat{\sigma}_B = [\sum_{b=1}^{B} (\hat{\theta}_b^* - \hat{\theta}_{(\cdot)}^*)^2/(B-1)]^{1/2}, \quad (12)$$

(12) 式中 $\hat{\theta}_{(\cdot)}^* = \sum_{b=1}^{B} \hat{\theta}_b^*/B$.

根據中心極限定理，當 $n \rightarrow \infty$，則 $\hat{\theta} \dot{\sim} N(\theta, \hat{\sigma}_B^2)$，亦即

$$\frac{\hat{\theta} - \theta}{\hat{\sigma}_B} \dot{\sim} Z(0,1). \quad (13)$$

Efron & Tibshirani (1993) 指出 (13) 式中 $(\hat{\theta} - \theta)/\hat{\sigma}_B$ 為近似樞紐量 (approximate pivot)。設定信賴係數為 $1 - \alpha$，則

$$-Z_{\alpha/2} < \frac{\hat{\theta} - \theta}{\hat{\sigma}_B} < Z_{\alpha/2}. \tag{14}$$

參數 θ 的近似信賴區間為

$$\hat{\theta} - Z_{\alpha/2}\,\hat{\sigma}_B < \theta < \hat{\theta} + Z_{\alpha/2}\,\hat{\sigma}_B. \tag{15}$$

(2) 百分位法 (BP)：自未知機率分布母體 $F$ 抽取一組樣本數為 $n$ 的樣本 $\mathbf{x} = (x_1, x_2, ..., x_n)$，再從樣本 $\mathbf{x}$ 重複進行 bootstrap 過程 $B$ 次，可獲得 $B$ 組 bootstrap 樣本 $\mathbf{x}^* = (\mathbf{x}_1^*, \mathbf{x}_2^*, ..., \mathbf{x}_B^*)$ 及計算 $\hat{\theta}_b^* = s(\mathbf{x}_b^*)$ 獲得 $B$ 個 bootstrap replications $\hat{\boldsymbol{\theta}}^* = (\hat{\theta}_1^*, \hat{\theta}_2^*, ..., \hat{\theta}_B^*)$。將 $\hat{\boldsymbol{\theta}}^*$ 按照由小到大的順序依次排列，若指定信賴係數為 $1 - \alpha$，則關於參數 θ 之百分位信賴區間下界 $\hat{\theta}_L$ 為 $\hat{\boldsymbol{\theta}}^*$ 排序後第 $100 \cdot (\alpha/2)$ 百分位數，即第 $B \cdot (\alpha/2)$ 個值；百分位信賴區間上界 $\hat{\theta}_U$ 則為 $\hat{\boldsymbol{\theta}}^*$ 排序後第 $100 \cdot (1 - \alpha/2)$ 百分位數，亦即第 $B \cdot (1 - \alpha/2)$ 個值。以本研究為例，設定信賴係數 $1 - \alpha = 0.95$，即 $\alpha = 0.05$；bootstrap 過程次數 $B = 1{,}000$。所以 $\hat{\theta}_L$ 等於 $\hat{\boldsymbol{\theta}}^*$ 排序後第 25 個 $\hat{\theta}^*$ 值；$\hat{\theta}_U$ 等於 $\hat{\boldsymbol{\theta}}^*$ 排序後第 976 個 $\hat{\theta}^*$ 值。

(3) bootstrap-$t$ 法 (B$t$)：自未知機率分布母體 $F$ 抽取一組樣本數為 $n$ 的樣本 $\mathbf{x} = (x_1, x_2, ..., x_n)$，根據 $\mathbf{x}$ 估計參數 θ 之估值 $\hat{\theta} = s(\mathbf{x})$ 及標準誤差 $\hat{\sigma}_{\hat{\theta}}$。從樣本 $\mathbf{x}$ 進行 bootstrap 過程，可獲得 bootstrap 樣本 $\mathbf{x}_b^*$，計算 bootstrap replication $\hat{\theta}_b^* = s(\mathbf{x}_b^*)$ 與標準誤差 $\hat{\sigma}_b^*$。近似樞鈕量 $t_b^*$ 為

$$t_b^* = \frac{\hat{\theta}_b^* - \hat{\theta}}{\hat{\sigma}_b^*}. \tag{16}$$

如此進行 $B$ 次 bootstrap 過程，可得到 $\hat{\boldsymbol{\theta}}^* = (\hat{\theta}_1^*, \hat{\theta}_2^*, ..., \hat{\theta}_B^*)$ 及 $\hat{\boldsymbol{\sigma}}^* = (\hat{\sigma}_1^*, \hat{\sigma}_2^*, ..., \hat{\sigma}_B^*)$，進而將 $\hat{\boldsymbol{\theta}}^*$ 及 $\hat{\boldsymbol{\sigma}}^*$ 分別代入 (16) 式求得 $\mathbf{t}^* = (t_1^*, t_2^*, ..., t_B^*)$。對於 $\mathbf{t}^*$ 按照由小到大的順序依次排列，若設定信賴係數為 $1 - \alpha$，則取 $\mathbf{t}^*$ 排序後位於第 $100 \cdot (\alpha/2)$ 及第 $100 \cdot (1 - \alpha/2)$ 百分位之 $t^*$ 值，可建構關於參數 θ 之 bootstrap-$t$ 信賴區間

$$\hat{\theta} - t_{\alpha/2}^* \cdot \hat{\sigma}_{\hat{\theta}} < \theta < \hat{\theta} + t_{1-\alpha/2}^* \cdot \hat{\sigma}_{\hat{\theta}}. \tag{17}$$

以本研究為例，設定信賴係數 $1 - \alpha = 0.95$，即 $\alpha = 0.05$；bootstrap 過程次數 $B = 1{,}000$。所以位於第 $100 \cdot (\alpha/2)$ 及第 $100 \cdot (1 - \alpha/2)$ 百分位之 $t^*$ 值分別是 $t_{(25)}^*$ 及 $t_{(976)}^*$。因此，(17) 式參數 θ 的 bootstrap-$t$ 信賴區間為

$$\theta - t_{(25)}^* \cdot \hat{\sigma}_{\hat{\theta}} < \theta < \hat{\theta} + t_{(976)}^* \cdot \hat{\sigma}_{\hat{\theta}}. \tag{18}$$

## 點估計及區間估計之評估指標

**點估計評估指標：**(1) RMSE：

$$\mathrm{RMSE} = [\frac{1}{M} \sum_{B=1}^{M} (\hat{\theta}_B^* - \theta)^2]^{1/2}. \tag{19}$$

(19) 式中，$\hat{\theta}_b^*$ 為參數 θ 之 bootstrap 估值，θ 為已知母體參數值，$M$ 為蒙地卡羅模擬次數，本研究設定蒙地卡羅模擬次數 $M$ 為 100,000 次。

(2) MABE：

$$\mathrm{MABE} = \frac{1}{M} \sum_{B=1}^{M} |(\hat{\theta}_B^* - \theta)|. \tag{20}$$

(20) 式中各參數符號代表意義同 (19) 式說明。

**區間估計評估指標：**(1) 覆蓋機率：對於真實參數 θ 的區間估式而言，該隨機區間估式能包含真實參數 θ 的機率稱為覆蓋機率 CP，本研究評估區間估計之 CP 的蒙地卡羅模擬演算法如下：

$$\mathrm{CP} = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^{M} I(\hat{\theta}_i). \tag{21}$$

(21) 式中，$\hat{\theta}_i$ 代表在進行 $M$ 次模擬簡單隨機抽樣中，第 $i$ 次估計所得到參數 θ 的估值，並由 $\hat{\theta}_i$ 估計求得隨機區間 $(\hat{\theta}_i^L, \hat{\theta}_i^U)$。令 $I(\hat{\theta}_i)$ 為指示函數 (indicator function)，則

$$I(\hat{\theta}_i) = \begin{cases} 1 & , if\ \hat{\theta}_i^L \le \theta \le \hat{\theta}_i^U \\ 0 & , otherwise \end{cases} \quad (22)$$

(2) 區間寬度期望值 (EL)：在本研究中設定信賴係數 $1-\alpha$，若進行蒙地卡羅模擬簡單隨機抽樣產生 $M$ 組信賴區間 $(\hat{\theta}_i^L, \hat{\theta}_i^U)$，$i = 1, 2, ..., M$，其中有 $n$ 組 $(n \le M)$ 信賴區間可覆蓋參數 θ，則期望區間長度為

$$EL = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(\hat{\theta}_i^U - \hat{\theta}_i^L). \quad (23)$$

## 統計程式撰寫

本研究中所進行之統計分析工作，皆以程式語言 “R” (3.5.1 版) 撰寫執行，其中 bootstrap 估計及蒙地卡羅模擬簡單隨機抽樣係調用 “base” (R Core Team 2018) 套件；原始坪割樣本資料進行 Johnson 分布轉換配適及樣本產生係調用 “SuppDists” (Wheeler 2016) 套件；由於模擬取樣及 bootstrap 估計過程之計算量極為龐大，因此調用 “foreach” (Microsoft Corp. *et al*. 2017) 及 “doParallel” (Microsoft Corp. *et al*. 2018) 等兩組套件以開啟計算機作業系統全部執行緒 (本研究共使用 8 個執行緒) 進行平行運算模式，可大幅提高運算效率減少待機時間。

# 結果

## 坪割樣本資料之敘述統計量

2017 年第 1 期作本分所溪口農場南北兩區坪割樣本資料之敘述統計量如表 1 所示，北區坪割樣本數為 45，樣本平均值為 9,183 kg ha$^{-1}$，樣本標準差為 2,318 kg ha$^{-1}$，樣本分布檢定顯示不符合常態分布 (*P*-value = 0.001456)，偏度 (skewness) 為 -0.755，峰度 (kurtosis) 為 -0.573，呈現長尾在左側之負偏態分布。南區坪割樣本數為 35，樣本平均值為 8,098 kg ha$^{-1}$，樣本標準差為 1,487 kg ha$^{-1}$，樣本分布檢定顯示符合常態分布 (*P*-value = 0.133900)，偏度為 0.112，峰度為 0.003。

## 坪割樣本資料之點估計及區間估計

已知 2017 年第 1 期作本分所溪口農場北區水稻實際單位面積產量為 8,811 kg ha$^{-1}$；南區為 8,017 kg ha$^{-1}$。坪割樣本資料對於農場單位面積產量進行點估計及區間估計結果如表 2 所示。在點估計方面，傳統估計法及 bootstrap 估計法對於農場南北兩區之實際單位面積產量均有高估的現象，在農場北區以 bootstrap 估計法高估幅度較較傳統估計法高出 21 kg ha$^{-1}$；在農場南區兩種估計法的高估幅度相當接近，以參數估計法較 bootstrap 估計法略高出 8 kg ha$^{-1}$。坪割樣本平均值之標準誤差在農場北區以 bootstrap 估計法較低，較傳統估計法減少 25 kg ha$^{-1}$；農場南區兩種參數估計法相當接近，傳統估計法較 bootstrap 估計法僅減少 1 kg ha$^{-1}$。至於傳統估計法、BN 估計法、BP 估計法及 B*t* 估計法對於區間估計表現，在 95% 之信心水準下，4 種區間估計法均能覆蓋母體參數實際值，BN 估計法之區間寬度為最窄，顯示 BN 估計法之區間估計精密度最高。

## 模擬比較各估計方法在不同母體分布及樣本數條件下之估計表現

以蒙地卡羅模擬在不同樣本數及母體參數條件下，比較傳統估計法及 bootstrap 估計之

表 1. 2017 年第 1 期作嘉義溪口農場水稻產量坪割樣本敘述統計量。

**Table 1.** Descriptive statistics of crop cutting surveys for rice grain yield in the first cropping season of 2017 in Xikou Farm of Chiayi Agricultural Experiment Branch of Taiwan Agricultural Research Institute.

| Farm region | Sample size | Average yield ± SD[z] (kg ha$^{-1}$) | Normality test[y] (*P*-value) | Skewness | Kurtosis |
|---|---|---|---|---|---|
| North | 45 | 9,183 ± 2,318 | 0.001456 | -0.755 | -0.573 |
| South | 35 | 8,098 ± 1,487 | 0.133900 | 0.112 | 0.003 |

[z] SD: Standard deviation.
[y] The normality test was analyzed by Shapiro-Wilk test.

表 2. 2017 年第 1 期作嘉義溪口農場水稻產量坪割資料估計結果。

**Table 2.** The estimation of crop cutting surveys for rice grain yield in the first cropping season of 2017 in Xikou Farm of Chiayi Agricultural Experiment Branch of Taiwan Agricultural Research Institute.

| Estimation method[z] | Yield (kg $ha^{-1}$) | Standard error (kg $ha^{-1}$) | Bias (kg $ha^{-1}$) | 95% UCI[y] | 95% LCI[x] | CI length |
|---|---|---|---|---|---|---|
| North region (Observed yield = 8,811 kg $ha^{-1}$) | | | | | | |
| Conventional | 9,183 | 345 | 372 | 9,879 | 8,486 | 1,393 |
| BN | 9,204 | 320 | 393 | 9,809 | 8,556 | 1,253 |
| BP | 9,204 | 320 | 393 | 9,832 | 8,558 | 1,274 |
| B*t* | 9,204 | 320 | 393 | 9,750 | 8,416 | 1,334 |
| South region (Observed yield = 8,017 kg $ha^{-1}$) | | | | | | |
| Conventional | 8,098 | 251 | 81 | 8,609 | 7,587 | 1,022 |
| BN | 8,089 | 252 | 73 | 8,593 | 7,603 | 990 |
| BP | 8,089 | 252 | 73 | 8,582 | 7,591 | 991 |
| B*t* | 8,089 | 252 | 73 | 8,624 | 7,573 | 1,051 |

[z] Conventional: conventional parametric; BN: bootstrap normal; BP: bootstrap percentile; and B*t*: bootstrap-*t*.
[y] The upper limit of the 95% confidence interval.
[x] The lower limit of the 95% confidence interval.

點估計及區間估計結果。其中模擬母體機率分布有兩種設定，一是設定農場北區及南區之坪割資料均來自常態分布，目的在於比較四種估計方法對於不同樣本大小之估計表現；另一是以農場北區及南區之原始坪割資料為基礎，通過 Johnson system 轉換模擬產生趨近於原始資料偏態程度之母體，目的在於比較各種估計方法對於偏態母體及抽樣數的估計表現。

## 模擬母體為常態分布

**點估計評估：**已知母體為常態分布，傳統估計法及 bootstrap 估計法在不同樣本數條件下對於母體平均值點估計結果如表 3 所示。由於農場南區母體標準差較北區為小，因此兩種估計法對於母體平均值進行點估計所得之 MABE 及 RMSE 指標，亦同樣普遍以南區較小。比較準確度指標 MABE，發現傳統估計法及 bootstrap 估計法之 MABE 均隨著樣本數增加而減少，以樣本數 $n$ 由 5 增加至 10 之 MABE 減少幅度為最大，其後即趨於平緩。農場北區於樣本數 $n$ = 5、15 及 100 等 3 種情況下，以 bootstrap 估計法較傳統估計法略高 1 kg $ha^{-1}$。在其他樣本數情況下，則兩種估計法之 MABE 大小均相同。農場南區則除了在樣本數 $n$ = 5 及 25 等兩種情況下，以 bootstrap 估計法較傳統估計法略高 1 kg $ha^{-1}$。而其他樣本數情況下，兩種估計法之 MABE 大小均相同。因此，可認為傳統估計法及 bootstrap 估計法對於點估計準確度的表現大致相同。

比較點估計精密度指標 RMSE，發現隨著樣本數增加，傳統估計法及 bootstrap 估計法之 RMSE 均呈現下降趨勢，尤其在樣本數 $n$ 由 5 增加至 10 的階段中，RMSE 之下降幅度最大，其後樣本數增加而 RMSE 下降幅度即趨於平緩。農場北區僅於樣本數 $n$ = 35 的情況下，以 bootstrap 估計法較傳統估計法略高 1 kg $ha^{-1}$。而在其他樣本數情況下，則兩種估計法之 RMSE 大小均相同。農場南區則在樣本數 $n$ = 5、10、25 及 35 等 4 種情況下，以 bootstrap 估計法較傳統估計法略高 1 kg $ha^{-1}$。而在其他樣本數情況下，兩種估計法之 RMSE 大小均相同。因此，可認為傳統估計法及 bootstrap 估計法對於點估計精密度的表現亦大致相同。

**區間估計評估：**已知母體為常態分布，設定信賴區間之信賴水準為 0.95，比較傳統估計法、BN 估計法、BP 估計法及 B*t* 估計法在不同樣本數條件下對於母體平均值區間估計結果如表 4 所示。四種區間估計法在農場北區及南區之覆蓋機率完全相同，然而因為農場南區母體分布之標準差較北區小，因此農場南區之區間寬度期望值普遍較北區為窄。BN 及 BP

表 3. 模擬取樣自農場北區及南區常態分布母體樣本點估計結果。

**Table 3.** The results of point estimation from normal distribution of group simulation sampling in Xikou Farm's northern and southern regions[z].

| | MABE | | RMSE | |
|---|---|---|---|---|
| Sample size | Conventional | Bootstrap | Conventional | Bootstrap |
| | | North region | | |
| $n = 5$ | 826 | 827 | 1,035 | 1,035 |
| $n = 10$ | 586 | 586 | 733 | 733 |
| $n = 15$ | 478 | 479 | 600 | 600 |
| $n = 20$ | 414 | 414 | 519 | 519 |
| $n = 25$ | 370 | 370 | 463 | 463 |
| $n = 30$ | 338 | 338 | 423 | 423 |
| $n = 35$ | 313 | 313 | 391 | 392 |
| $n = 40$ | 293 | 293 | 367 | 367 |
| $n = 45$ | 276 | 276 | 346 | 346 |
| $n = 50$ | 262 | 262 | 328 | 328 |
| $n = 100$ | 184 | 185 | 232 | 232 |
| | | South region | | |
| $n = 5$ | 530 | 531 | 664 | 665 |
| $n = 10$ | 376 | 376 | 470 | 471 |
| $n = 15$ | 307 | 307 | 385 | 385 |
| $n = 20$ | 266 | 266 | 333 | 333 |
| $n = 25$ | 237 | 238 | 297 | 298 |
| $n = 30$ | 217 | 217 | 272 | 272 |
| $n = 35$ | 201 | 201 | 251 | 252 |
| $n = 40$ | 188 | 188 | 235 | 235 |
| $n = 45$ | 177 | 177 | 222 | 222 |
| $n = 50$ | 168 | 168 | 211 | 211 |
| $n = 100$ | 119 | 119 | 149 | 149 |

[z] MABE: mean absolute bias error; RMSE: root mean square error.

估計法僅在樣本數 $n = 100$ 時其覆蓋機率達 0.95，在其他樣本數情況下均未達 0.95。然而，區間寬度期望值卻較傳統估計法及 B$t$ 估計法為窄，在 $n \geq 15$ 的情況下，概以 BN 估計法為四種估計法中最窄者。實際上，當樣本數 $n \geq 25$，BN 及 BP 估計法之覆蓋機率即達 0.94，犯第一型錯誤 (type I error) 的機率雖然增加 0.01，然而區間估計之精密度卻有所提高。以農場北區為例，$n = 25$ 以 BN 估計法所得之區間寬度期望值較傳統估計法縮減 130 kg ha$^{-1}$。因此若母體分布已知，不希望因為提高樣本數造成抽樣成本的負擔，BN 及 BP 估計法不失為值得考慮採用的區間估計法。

## 模擬母體為偏態分布

將農場北區及南區坪割資料配適轉換為 Johnson 分布，藉此模擬產生偏態母體。轉換後母體參數之敘述統計量分別為，北區：平均值 9,234.51 kg ha$^{-1}$、標準差 2,178.65 kg ha$^{-1}$、偏度 -0.7999、峰度 -0.2843。南區：平均值 8,098.01 kg ha$^{-1}$、標準差 1,465.94 kg ha$^{-1}$、偏度 0.1121、峰度 0.0224。

**點估計評估：**已知母體為偏態分布，傳統估計法及 bootstrap 估計法在不同樣本數條件下，對於母體平均值點估計結果如表 5 所示。比較兩種估計法在農場北區及南區之 MABE 及 RMSE 指標表現，發現普遍以南區較小。比較準確度指標 MABE，發現傳統估計法及 bootstrap 估計法之 MABE 均隨著樣本數增加而減少，以樣本數 $n$ 由 5 增加至 10 之 MABE 減少幅度為最大，其後即趨於平緩。農場北區於樣本數 $n = 5$ 及 10 等兩種情況下，以 bootstrap 估計法較傳統估計法略高 1 kg ha$^{-1}$。而在其他樣本數情況下，兩種估計法之 MABE 大小均相同。農場南區則僅在樣本數 $n = 10$ 的情況下，

表 4. 模擬取樣自農場北區及南區常態分布母體樣本區間估計結果。

**Table 4.** The results of interval estimation from normal distribution of group simulation sampling in Xikou Farm's northern and southern regions[z].

| Sample size | Coverage probability | | | | Expected length | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Conventional | BN | BP | B*t* | Conventional | BN | BP | B*t* |
| North region | | | | | | | | |
| *n* = 5 | 0.950 | 0.846 | 0.838 | 0.950 | 5,547 | 3,608 | 3,566 | 8,880 |
| *n* = 10 | 0.950 | 0.905 | 0.902 | 0.950 | 3,265 | 2,701 | 2,699 | 3,527 |
| *n* = 15 | 0.950 | 0.921 | 0.920 | 0.950 | 2,542 | 2,250 | 2,254 | 2,627 |
| *n* = 20 | 0.951 | 0.930 | 0.929 | 0.951 | 2,153 | 1,968 | 1,974 | 2,197 |
| *n* = 25 | 0.951 | 0.935 | 0.934 | 0.951 | 1,902 | 1,772 | 1,778 | 1,929 |
| *n* = 30 | 0.951 | 0.937 | 0.937 | 0.950 | 1,723 | 1,624 | 1,630 | 1,742 |
| *n* = 35 | 0.951 | 0.939 | 0.939 | 0.951 | 1,586 | 1,508 | 1,513 | 1,601 |
| *n* = 40 | 0.950 | 0.940 | 0.940 | 0.950 | 1,477 | 1,414 | 1,419 | 1,489 |
| *n* = 45 | 0.950 | 0.941 | 0.941 | 0.950 | 1,388 | 1,335 | 1,340 | 1,398 |
| *n* = 50 | 0.950 | 0.942 | 0.942 | 0.951 | 1,313 | 1,268 | 1,273 | 1,322 |
| *n* = 100 | 0.950 | 0.946 | 0.946 | 0.950 | 918 | 902 | 906 | 923 |
| South region | | | | | | | | |
| *n* = 5 | 0.950 | 0.845 | 0.838 | 0.950 | 3,560 | 2,316 | 2,289 | 5,699 |
| *n* = 10 | 0.950 | 0.905 | 0.902 | 0.950 | 2,095 | 1,733 | 1,732 | 2,263 |
| *n* = 15 | 0.950 | 0.921 | 0.920 | 0.950 | 1,631 | 1,444 | 1,447 | 1,686 |
| *n* = 20 | 0.951 | 0.930 | 0.929 | 0.951 | 1,382 | 1,263 | 1,267 | 1,410 |
| *n* = 25 | 0.951 | 0.935 | 0.934 | 0.951 | 1,221 | 1,137 | 1,141 | 1,238 |
| *n* = 30 | 0.951 | 0.937 | 0.937 | 0.950 | 1,106 | 1,042 | 1,046 | 1,118 |
| *n* = 35 | 0.951 | 0.939 | 0.939 | 0.951 | 1,018 | 968 | 971 | 1,027 |
| *n* = 40 | 0.950 | 0.940 | 0.940 | 0.950 | 948 | 907 | 911 | 956 |
| *n* = 45 | 0.950 | 0.941 | 0.941 | 0.950 | 891 | 857 | 860 | 897 |
| *n* = 50 | 0.950 | 0.942 | 0.942 | 0.951 | 843 | 814 | 817 | 848 |
| *n* = 100 | 0.950 | 0.946 | 0.946 | 0.950 | 589 | 579 | 582 | 592 |

[z] Conventional: conventional parametric; BN: bootstrap normal; BP: bootstrap percentile; and B*t*: bootstrap-*t*.

bootstrap 估計法較傳統估計法略高 1 kg $ha^{-1}$。而在其他樣本數情況下，兩種估計法之 MABE 大小均相同。因此，可認為傳統估計法及 bootstrap 估計法對於點估計準確度的表現大致相同。

比較兩種估計法之 RMSE 表現，發現隨著樣本數增加，傳統估計法及 bootstrap 估計法之 RMSE 均呈現下降趨勢，尤其以樣本數 $n$ 由 5 增加至 10，其 RMSE 下降幅度最大，其後樣本數增加而 RMSE 下降幅度即趨於平緩。農場北區與南區僅分別在樣本數 $n$ = 25 及 15 之情況下，以 bootstrap 估計法較傳統估計法略高 1 kg $ha^{-1}$。而在其他樣本數情況下，兩種估計法之 RMSE 大小均相同。因此，可認為傳統估計法及 bootstrap 估計法對於點估計精密度的表現亦大致相同。

**區間估計評估：**已知農場北區及南區母體分布有不同偏度及峰度，設定信賴區間之信賴水準為 0.95，比較傳統估計法、BN 估計法、BP 估計法及 B*t* 估計法在不同樣本數條件下對於母體平均值區間估計結果，如表 6 所示。農場北區母體分布型態為長尾在左側之負偏態分布，傳統估計法僅在樣本數 $n \geq 50$ 其覆蓋機率方相當接近 0.95 的水準；而三種 bootstrap 估計法在所有樣本數條件下，僅有 B*t* 估計法之覆蓋機率達到 0.95 或以上，BN 及 BP 估計法則均未達 0.95 的水準。雖然 B*t* 估計法之覆蓋機率的表現最佳，但是區間寬度期望值也是四種估計法當中最寬者。當樣本數 $n$ = 45，BN 及 BP 估計法之覆蓋機率相當接近 0.94，然而區間寬度期望值卻較傳統估計法分別減少 50 kg $ha^{-1}$ 及 48 kg $ha^{-1}$。因此，若母體為有偏分布，在控制抽樣成本的考慮下，選擇 BN 及 BP 估計法進行區間估計可獲得大致滿意之覆

表 5. 模擬取樣自農場北區及南區偏態分布母體樣本點估計結果。

**Table 5.** The results of point estimation from skewed distribution of group simulation sampling in Xikou Farm's northern and southern regions[z].

| Sample size | MABE | | RMSE | |
|---|---|---|---|---|
| | Conventional | Bootstrap | Conventional | Bootstrap |
| North region (mean = 9,235; standard deviation = 2,179; skewness = -0.7999; kurtosis = -0.2843) | | | | |
| $n$ = 5 | 788 | 789 | 979 | 979 |
| $n$ = 10 | 555 | 556 | 692 | 692 |
| $n$ = 15 | 454 | 454 | 567 | 567 |
| $n$ = 20 | 393 | 393 | 490 | 490 |
| $n$ = 25 | 351 | 351 | 438 | 439 |
| $n$ = 30 | 320 | 320 | 400 | 400 |
| $n$ = 35 | 297 | 297 | 371 | 371 |
| $n$ = 40 | 277 | 277 | 347 | 347 |
| $n$ = 45 | 262 | 262 | 327 | 327 |
| $n$ = 50 | 248 | 248 | 310 | 310 |
| $n$ = 100 | 175 | 175 | 220 | 220 |
| South region (mean = 8,098; standard deviation = 1,466; skewness = 0.1121; kurtosis = 0.0224) | | | | |
| $n$ = 5 | 523 | 523 | 655 | 655 |
| $n$ = 10 | 370 | 371 | 464 | 464 |
| $n$ = 15 | 303 | 303 | 379 | 380 |
| $n$ = 20 | 262 | 262 | 328 | 328 |
| $n$ = 25 | 234 | 234 | 293 | 293 |
| $n$ = 30 | 214 | 214 | 268 | 268 |
| $n$ = 35 | 198 | 198 | 248 | 248 |
| $n$ = 40 | 185 | 185 | 232 | 232 |
| $n$ = 45 | 175 | 175 | 219 | 219 |
| $n$ = 50 | 166 | 166 | 207 | 208 |
| $n$ = 100 | 117 | 117 | 147 | 147 |

[z] MABE: mean absolute bias error; RMSE: root mean square error.

蓋機率及最窄區間寬度期望值。農場南區母體分布型態略呈正偏態，傳統估計法及 B$t$ 估計法在所有樣本數條件下之覆蓋機率均為 0.95，而 BN 及 BP 估計法僅在樣本數 $n$ = 100 時覆蓋機率方接近到 0.95。區間寬度期望值在樣本數 $n \leq 10$ 以 BP 估計法為最窄，其他樣本數條件下則以 BN 估計法最窄，而 B$t$ 估計法區的間寬度期望值為所有樣本數條件下之最寬者。與農場北區不同的是，農場南區樣本數 $n$ = 30 時，BN 及 BP 估計法之覆蓋機率即相當接近 0.94，此時區間寬度期望值較傳統估計法分別減少 63 kg $ha^{-1}$ 及 59 kg $ha^{-1}$。

## 討論

bootstrap 估計原理係在母體分布未知的情況下，根據既有的樣本資料，建構出一組類比於母體分布之經驗分布。再從原始樣本中以歸還取樣方式大量重複取出樣本數與原始樣本相同之 bootstrap 樣本，並由 bootstrap 樣本中計算統計量，形成一組新的 bootstrap 統計量分布，藉此間接推估某些難以推導出解析式之母體參數特徵或進行區間估計。因此，決定 bootstrap 估計表現好壞的因素，取決於樣本與母體分布的近似程度。本研究中傳統估計法及 bootstrap 估計法對於母體未知參數之點估計表現幾乎相同 (表 3 及表 5)，事實上，若要提高點估計的精確度，惟有增加樣本數及調整取樣方式，以減少取樣誤差與系統誤差。由以上 bootstrap 估計過程可知並未增加額外的樣本資訊，因此對於點估計精確度的增加助益不大。

對於研究人員而言，區間估計所提供訊息量通常較點估計更為豐富。然而有時因客觀環

境的限制，研究人員所能得到的樣本數極為有限，甚至僅有一次取樣機會。鑒於多數情況下無法滿足傳統估計法對於區間估計所加諸之條件，bootstrap 估計法之價值在捨棄或減少傳統估計法的限制，並將樣本資料中所包含的資訊完全榨取殆盡，盡可能將母體分布類比出來，進而建構具合理精確度之信賴區間。以農場北區母體為負偏態分布為例 (表 6)，僅有 B*t* 估計法在所有樣本數條件下覆蓋機率均保持 0.95 或以上的水準。又例如在小樣本數 ($n$ = 5 及 $n$ = 10) 的極端情況下，BN 及 BP 估計法之區間寬度期望值遠較其他兩種估計法為窄，尤以 BP 估計法的表現最佳，可見 bootstrap 估計法對於區間估計精確度表現具有相當的穩健性。一般區間估計之覆蓋機率 (準確度) 及區間寬度 (精密度) 大小往往是互相消長，高覆蓋機率 (準確度高) 伴隨大區間寬度 (精密度低)，反之亦然。很少有一種估計法對於評估區間估計之兩項指標有一致最佳表現，研究人員通常必須在抽樣成本、估計準確度及精密度三者之中採取折衷取捨，以期投入最經濟的抽樣成本，獲得最大的估計效率。就本研究結果顯示，在小樣本數 $n$ = 15 至 $n$ = 25 的情況下，BP 估計法的準確度雖略低於傳統估計法，但是精密度卻較傳統估計法相對提高。因此，若受限於預算經費而難以增加調查樣本數，則 BP 估計法是值得考慮使用的區間估計方法。

## 誌謝

本研究承行政院農業委員會科技計畫 106 農科-8.2.2-農-C2 經費挹注，試驗規劃、調查及資料整理承農業試驗所農業化學組陳琦玲博士、本分所溪口農場許錦城、張慶榮、張宏謀及劉秀蓁等同仁協助，特此誌謝。

**表 6.** 模擬取樣自農場北區及南區偏態分布母體樣本區間估計結果。

**Table 6.** The results of interval estimation from skewed distribution of group simulation sampling in Xikou Farm's northern and southern regions[z].

| Sample size | Coverage probability | | | | Expected length | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Conventional | BN | BP | B*t* | Conventional | BN | BP | B*t* |
| North region (mean = 9,235; standard deviation = 2,179; skewness = -0.7999; kurtosis = -0.2843) | | | | | | | | |
| $n$ = 5 | 0.909 | 0.815 | 0.822 | 0.946 | 5,394 | 3,530 | 3,453 | 11,396 |
| $n$ = 10 | 0.929 | 0.885 | 0.894 | 0.963 | 3,135 | 2,601 | 2,582 | 3,779 |
| $n$ = 15 | 0.935 | 0.907 | 0.915 | 0.964 | 2,428 | 2,153 | 2,146 | 2,654 |
| $n$ = 20 | 0.940 | 0.918 | 0.925 | 0.964 | 2,051 | 1,877 | 1,874 | 2,168 |
| $n$ = 25 | 0.941 | 0.925 | 0.931 | 0.963 | 1,809 | 1,686 | 1,685 | 1,883 |
| $n$ = 30 | 0.943 | 0.929 | 0.934 | 0.962 | 1,637 | 1,544 | 1,545 | 1,690 |
| $n$ = 35 | 0.943 | 0.932 | 0.936 | 0.961 | 1,506 | 1,432 | 1,434 | 1,546 |
| $n$ = 40 | 0.944 | 0.933 | 0.938 | 0.959 | 1,402 | 1,342 | 1,344 | 1,434 |
| $n$ = 45 | 0.944 | 0.935 | 0.939 | 0.958 | 1,317 | 1,267 | 1,269 | 1,344 |
| $n$ = 50 | 0.945 | 0.937 | 0.941 | 0.958 | 1,246 | 1,203 | 1,205 | 1,268 |
| $n$ = 100 | 0.945 | 0.941 | 0.943 | 0.953 | 870 | 855 | 857 | 879 |
| South region (mean = 8,098; standard deviation = 1,466; skewness = 0.1121; kurtosis = 0.0224) | | | | | | | | |
| $n$ = 5 | 0.950 | 0.845 | 0.838 | 0.950 | 3,508 | 2,282 | 2,255 | 5,624 |
| $n$ = 10 | 0.950 | 0.905 | 0.903 | 0.950 | 2,065 | 1,708 | 1,707 | 2,232 |
| $n$ = 15 | 0.950 | 0.921 | 0.920 | 0.950 | 1,607 | 1,423 | 1,426 | 1,663 |
| $n$ = 20 | 0.951 | 0.930 | 0.930 | 0.951 | 1,362 | 1,245 | 1,248 | 1,390 |
| $n$ = 25 | 0.951 | 0.934 | 0.934 | 0.951 | 1,203 | 1,121 | 1,124 | 1,221 |
| $n$ = 30 | 0.951 | 0.937 | 0.937 | 0.951 | 1,090 | 1,027 | 1,031 | 1,102 |
| $n$ = 35 | 0.951 | 0.939 | 0.939 | 0.951 | 1,003 | 954 | 957 | 1,013 |
| $n$ = 40 | 0.950 | 0.940 | 0.940 | 0.950 | 934 | 894 | 897 | 942 |
| $n$ = 45 | 0.950 | 0.941 | 0.941 | 0.950 | 878 | 844 | 848 | 885 |
| $n$ = 50 | 0.950 | 0.942 | 0.942 | 0.951 | 831 | 802 | 805 | 836 |
| $n$ = 100 | 0.950 | 0.946 | 0.946 | 0.950 | 581 | 571 | 573 | 584 |

[z] Conventional: conventional parametric; BN: bootstrap normal; BP: bootstrap percentile; and B*t*: bootstrap-*t*.

# 引用文獻

Council of Agriculture. 2016. Agricultural Statistics Yearbook . Council of Agriculture, Executive Yuan. Taipei, Taiwan. 393 pp. (in Chinese)

Efron, B. 1979. Bootstrap methods: Another look at the jackknife. Ann. Stat. 7:1–26.

Efron, B. 1981. Nonparametric standard errors and confidence intervals. Can. J. Stat. 9:139–158.

Efron, B. and R. Tibshirani. 1986. Bootstrap methods for standard errors, confidence intervals, and other measures of statistical accuracy. Stat. Sci. 1:54–75.

Efron, B. and R. Tibshirani. 1993. An Introduction to the Bootstrap. Chapman & Hall. New York, NY. 436 pp.

Hubback, J. A. 1946. Sampling for rice yield in Bihar and Orissa. Sankhyā 7:281–294.

Johnson, N. L. 1949. Systems of frequency curves generated by methods of translation. Biometrika 36: 149–176.

Mahalanobis, P. C. 1944. On large-scale sample surveys. Phil. Trans. Roy. Soc. 231:329–451.

Mahalanobis, P. C. 1946. Sample surveys of crop yields in India. Sankhyā 7:269–280.

Microsoft Corp., C. Rich, and S. Weston. 2017. Foreach: Provides foreach looping construct for R. R package version 1.4.4. https://cran.r-project.org/package=foreach (visit on 10/8/2018)

Microsoft Corp., R. Calaway, D. Tenenbaum, and S. Weston. 2018. doParallel: Foreach parallel adaptor for the “parallel” package. R package version 1.0.14. https://cran.r-project.org/package=doparallel (visit on 10/8/2018)

Miller, R. G. 1974. The jackknife- A review. Biometrika 61:1–15.

Quenouille, M. H. 1949. Approximate tests of correlation in time-series. J. R. Statist. Soc. B. 11:68–84.

Quenouille, M. H. 1956. Notes on bias in estimation. Biometrika 43:353–360.

R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. http://softlibre.unizar.es/manuales/aplicaciones/r/fullrefman.pdf (visit on 10/8/2018)

Tukey, J. W. 1958. Bias and confidence in not-quite large samples (abstract). Ann. Math. Statist. 29:614.

Wheeler, B. 2016. SuppDists: Supplementary distributions. R package version 1.1-9.4. https://cran.r-project.org/package=suppdists (visit on 10/8/2018)

# Studies on Application of Bootstrap Method to Estimate the Crop Cutting Surveys of Rice Grain Yield

Chih-Hao Chiu[1] and Dah-Jing Liao[2,*]

## Abstract

Chiu, C. H. and D. J. Liao. 2019. Studies on application of bootstrap method to estimate the crop cutting surveys of rice grain yield. J. Taiwan Agric. Res. 68(3):202–214.

This study used the data collected from Xikou Farm of Chiayi Agricultural Experiment Branch of Taiwan Agricultural Research Institute in 2017 to estimate the crop cutting surveys of rice grain yield. Monte simulation of sampling was adopted to realize the performance between the point estimation and interval estimation, while bootstrap method was in the conditions of different group distributions and different samplings, then it was compared to conventional parametric estimation. The results showed that point estimation from bootstrap and parametric estimation was nearly identical, no matter the group distribution was normal or skewed distribution, or the sampling size was small ($n < 30$), or large sample. The bootstrap method of point estimation did not add new sampling information, so it could not increase precision of point estimation a lot. In the interval estimation, compared to the performances of 4 interval estimations of conventional parametric estimation, bootstrap normal (BN), bootstrap percentile (BP) and bootstrap-*t* (B*t*) in 0.95 confidence coefficient, the coverage probability of B*t* reached 0.95 or higher in the conditions of any group distributions and samplings. BN and BP reached nearly 0.95, while its group was normal distribution and its sample size was 100. Expected length of BN and BP were narrower than others, but B*t* was the widest one. In reality, both coverage probability and expected length varied alternatively while confidence coefficient was fixed. This study showed that in the conditions of various group distributions and samplings, the coverage probability and expected length from bootstrap methods got the best performances, implying that bootstrap method was relatively robust to estimate the performance of the interval estimation precisely.

**Key words:** Rice, Crop cutting surveys, Bootstrapping, Monte Carlo simulation.

---

Received: October 22, 2018; Accepted: February 22, 2019.
[*] Corresponding author, e-mail: djliao@dns.caes.gov.tw
[1] Assistant Research Fellow, Agronomy Department, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.
[2] Associate Research Fellow, Agronomy Department, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 68(3):215–225 (2019)
DOI:10.6156/JTAR.201909_68(3).0003 研究報告

# 秋水仙素處理離體培養桔梗種子苗誘導多倍體之影響因子研究

夏奇鋌[1,*] 陳威臣[2] 曹進義[3]

## 摘要

夏奇鋌、陳威臣、曹進義。2019。秋水仙素處理離體培養桔梗種子苗誘導多倍體之影響因子研究。台灣農業研究 68(3):215–225。

桔梗 (*Platycodon grandiflorum* A. DC.) 為重要之傳統中藥材，但因其種原單純，因此不易藉由雜交育種改進其遺傳特性，而利用秋水仙素誘導多倍體是創新種質的方法之一。本研究以無菌播種後不同發育階段之桔梗種子苗作為培植體，比較秋水仙素濃度、處理時間及秋水仙素在固態或液態培養基中施用對於多倍體化誘導之影響。成活植株以流式細胞儀檢測其染色體倍體數，建立以離體培養方式施用秋水仙素誘導多倍體桔梗之處理條件。研究結果顯示，培植體的存活率主要受到秋水仙素處理時間的影響，且處理時間與種子苗的發育階段具有顯著之交感效應。在多倍體誘導方面，以子葉期桔梗苗為培植體，在含有 1.25 mM 秋水仙素的液態培養基中震盪培養 6 d，或在含有 2.50 mM 秋水仙素之固態培養基中培養 3 d，可獲得高於 80% 之培植體存活率，且多倍體誘導率在 60% 以上。

**關鍵詞**：桔梗、多倍體、四倍體、秋水仙素、離體培養。

## 前言

中草藥產業為生物科技產業發展之重點項目，而優良中草藥品種的育成及其健康種苗的生產，將直接影響原物料的優劣，係為奠定中草藥產業發展之關鍵重點。桔梗 (*Platycodon grandiflorum* A. DC.) 為桔梗科、桔梗屬多年生草本植物，在不同國家有不同的名稱，在韓國稱為道拉機 (Doraji)，在日本稱為奇京 (Kikyo)，在中國則稱為桔梗 (Jiegeng)。桔梗以根入藥，具有宣肺、祛痰、鎮咳、利咽、排膿等作用，屬大宗使用之傳統中藥材 (Nyakudya *et al*. 2014)。桔梗種原在全世界僅有 1 種及 1 變種，受限於種質單純，並不易藉由雜交育種來改進其遺傳特性，而誘變或多倍體化可創造遺傳種質的變化。藉由將這些遺傳變化的材料運用於育種流程，選拔出具有高指標成分並適應當地風土氣候之新品系 (Xu *et al*. 2004)。多倍體植株一般具有生長勢強、生質產量高、花朵大、花色深、香氣濃郁等優良特性，具稔性之多倍體植株可作為雜交育種之親本，創造更多優良新品種 (Acquah 2007)。此外，對於中草藥植物而言，多倍體還具有營養器官變大、藥用成分提高及抗逆性較強的優點，對產業價值之提升更為有利 (Zhou *et al*. 2008)。桔梗在台灣並無商業栽培，且其種質單純因此較難經由選種或雜交進行改進，而創造遺傳多樣化之多倍體作為育種材料應為可行之策略。

秋水仙素 (colchicine) 是人工誘導多倍體化最常使用之藥劑，於田間施用時易受到外在環境的變化而減低其效用，並較易產生複合倍體 (mixoploidy)；另一方面，以試管內 (*in vi-*

投稿日期：2018 年 7 月 9 日；接受日期 :2019 年 3 月 14 日。
[*] 通訊作者：hsia@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所生物技術組聘用助理研究員。台灣 台中市。

*tro*) 或稱為離體培養方式誘導多倍體，因環境因子與處理條件較易於掌控，多倍體誘導率遠高於田間處理 (Petersen *et al*. 2003; Dhooghe *et al*. 2011)。影響以離體培養方式進行秋水仙素誘導多倍體化的因子眾多，其中以施用濃度與處理時間最常被探討，而誘導多倍體所使用之培植體及秋水仙素施用之型態 (於固態或液態培養基中施用) 則較少被探討 (Petersen *et al*. 2002; de Carvalho *et al*. 2005; Hsia *et al*. 2009, 2010)。

本研究希望首先藉由人工誘導多倍體化，創造遺傳變化的桔梗育種材料，且為創造更多之遺傳變異。本研究採用無菌播種而來的桔梗種子苗作為培植體，測試秋水仙素濃度與時間之組合處理，並比較以不同發育階段種子苗於含有秋水仙素之固態或液態培養基中處理對多倍體誘導的影響。在創出遺傳多樣化的多倍體後，經由育種流程選拔藥用成分及產量增加之優良多倍體加以利用，則列為第二階段之目標。

# 材料與方法

## 建立桔梗瓶苗

桔梗 (*P. grandiflorum* A. DC.) 種子贈自行政院農委會農業試驗所育種人員，將種子以 70% 酒精表面消毒 1 min，再以 2% (v/v) 次氯酸鈉水 (稀釋自 Clorox Bleach, Clorox, Oakland, CA, USA) 消毒 30 min 後，以無菌水清洗 3 次。將消毒完成之種子，接種於含半量 MS (Murashige & Skoog 1962) 基本鹽類配方並添加 30 g $L^{-1}$ 蔗糖及 8 g $L^{-1}$ 惠光洋菜之基本培養基中培養。培養基於滅菌前將 pH 調至 5.7 ± 0.1，接種後之培養皿置於 26℃ ± 2℃、38 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$ 光強度、光照 16 h 環境中培養。

## 秋水仙素濃度與處理時間組合試驗

以無菌播種 1 wk 後具 2 片展開子葉之小苗 (子葉期苗)，以全株浸入方式接種於含有 1.25 mM 或 2.50 mM 秋水仙素 (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) 之液態再生培養基中，分別以水平震盪方式培養 3、6、9 及 12 d，震盪速率為 70–80 rpm。再生培養基，為上述之基本培養基添加 2 mg $L^{-1}$ benzyladenine (BA) 與 0.5 mg $L^{-1}$ α-naphthaleneacetic acid (NAA)。培養容器為 125 mL 三角瓶內裝 10 mL 培養液，每瓶接種 10 株小苗，每處理共 5 瓶。震盪培養的環境溫度及光照條件，與上述瓶苗培養相同。

## 不同發育時期培植體於固態或液態培養基中施用秋水仙素不同時間之組合試驗

以播種 3 wk 後同時具 2 片子葉及 2 片真葉之小苗 (真葉期苗)，以及上述之子葉期苗作為培植體，接種於含有 2.50 mM 秋水仙素之固態或液態再生培養基中進行處理，處理時間分別為液態培養的 1 d 或 3 d，震盪培養條件同上。固態培養為將小苗基部插入培養基中培養 3 d 或 6 d，其他培養條件同前所述。

## 多倍體檢測

秋水仙素處理後將小苗繼代至不含秋水仙素之固態基本培養基中培養，4 wk 後調查其存活率，並將存活芽體受傷之根部切除後，再次繼代於基本培養基中進行發根培養。發根後之瓶苗，取出種植於溫室。成活植株於瓶苗階段，切取其新長出之葉片，以流式細胞儀進行倍體數分析。流式細胞儀 (Partec, Nürnberg, Germany) 檢測方法，為切取 1 $cm^2$ 幼嫩葉片，加入 0.4 mL CyStain UV Precise P 萃取液，以刀片將葉片組織細切後以過濾膜過濾。在濾液中添加 0.8 mL CyStain UV Precise P 染色液，靜置 3 min 後進行檢測，每一樣品分析 5,000 個細胞。

## 統計分析方法

試驗採用完全逢機設計 (completely randomized design; CRD)，培植體存活率百分比以 $\sin^{-1}$ 角度轉換後，再以 SAS Enterprise Guide 7.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 套裝統計分析軟體進行 analysis of variance (ANOVA) 變方分析。若處理間差異顯著 ($P < 0.05$)，則利用 least significant difference test (LSD) 比較各處理平均值間的差異。

# 結果

## 秋水仙素濃度與處理時間對子葉期種子苗多倍體化誘導之影響

以子葉期桔梗種子苗為培植體，接種於含有 1.25 mM 或 2.50 mM 秋水仙素之液態培養基中，震盪處理 3–12 d，並於繼代培養 4 wk 後調查小苗之存活率。試驗結果顯示，秋水仙素濃度與處理時間兩個因子中，僅處理時間對於小苗存活率與芽體增殖率具有顯著之影響 ($P < 0.01$)，且秋水仙素濃度與處理時間的交感效應對小苗存活率與芽體增殖率之影響皆不顯著 (表 1)。秋水仙素處理時間未超過 6 d 時，小苗存活率可維持在 88.0–92.0% 間，隨著處理天數增加至 9 d 及以上時，2 種濃度之小苗存活率皆下降至 62.0–70.0%。同樣的，芽體增殖率亦明顯受處理天數之影響 ($P < 0.01$)，且與小苗存活率具有相同之趨勢，亦即處理天數增至 9 d 及以上時，芽體增殖率會明顯下降。8 種處理中以 1.25 mM 濃度處理 3 d 之芽體增殖數為 1.72 芽/株最高，而以 9 d 及 12 d 處理之增殖芽數最低 (0.62–0.76 芽/株)。桔梗苗在秋水仙素處理後繼代至基本培養基中繼續培養 4 wk，各處理培植體生長與增殖之情形如圖 1 所示。秋水仙素處理後之成活植株，以流式細胞儀檢測其倍體數，植株之倍體表現比率如表 1 所示，其中 12 d 處理組因成活苗數太少因而未進行檢測。比較兩種濃度對多倍體 (總多倍體 = 3C + 4C + 6C) 誘導的影響，依處理天數 (3 d、6 d、9 d) 來看，分別為 1.25 mM 之 48.0、60.8 及 83.3%，以及 2.50 mM 之 23.6、38.1 及 66.7%。顯示 1.25 mM 較 2.50 mM 處理可獲得較高之多倍體比率，多倍體的比率會隨著處理天數增加而提高，且在兩種濃度皆有相同之趨勢；但秋水仙素處理時間延長至 9 d 時，雖然多倍體比率增加，但因成活株數減少，因此實際上兩種濃度皆以 6 d 處理可獲得最高之多倍體株數。

## 秋水仙素於液態培養基中施用不同時間對不同發育時期培植體多倍體化誘導之影響

利用不同發育階段之小苗 (子葉期或真葉期苗)，在含有 2.50 mM 秋水仙素之液態再生培養基中處理 1 d 或 3 d，並於繼代培養 4 wk 後調查小苗之存活率。結果顯示，秋水仙素處理天數及處理天數與小苗發育期的交感效應，對小苗存活率皆有顯著之影響 ($P < 0.01$)，

表 1. 離體培養子葉期桔梗種子苗以秋水仙素濃度配合天數於液態培養方式處理對多倍體誘導之影響。

**Table 1.** Effects of concentration and exposure duration of colchicine in liquid culture on polyploidy induction by using cotyledon stage seedlings of *Platycodon grandiflorum* A. DC.

| Colchicine (mM) | Duration (d) | Treated seedling | Survival rate (%)[z] | Shoots/ explant | Examined plants | Ploidy (%) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | 2C | 3C | 4C | 6C | Chimera |
| 1.25 | 3 | 50 | 92.0 ± 8.4 a[y] | 1.72 ± 0.22 a | 23 | 52.0 | 24.0 | 12.0 | 12.0 | 0.0 |
| | 6 | 50 | 92.0 ± 8.4 a | 1.26 ± 0.15 b | 23 | 39.1 | 26.1 | 30.5 | 4.3 | 0.0 |
| | 9 | 50 | 62.0 ± 8.4 b | 0.62 ± 0.08 c | 6 | 16.7 | 33.3 | 50.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 12 | 50 | 68.0 ± 16.4 b | 0.76 ± 0.19 c | 0 | - | - | - | - | - |
| 2.50 | 3 | 50 | 88.0 ± 4.5 ab | 1.40 ± 0.16 b | 17 | 70.6 | 11.8 | 11.8 | 0.0 | 5.8 |
| | 6 | 50 | 92.0 ± 8.4 a | 1.20 ± 0.19 b | 21 | 61.9 | 9.5 | 28.6 | 0.0 | 0.0 |
| | 9 | 50 | 70.0 ± 20.0 b | 0.74 ± 0.25 c | 6 | 33.3 | 0.0 | 66.7 | 0.0 | 0.0 |
| | 12 | 50 | 66.0 ± 16.7 b | 0.66 ± 0.17 c | 0 | - | - | - | - | - |
| Concentration | | | NS[x] | NS | | | | | | |
| Duration | | | ** | ** | | | | | | |
| Concentration × Duration | | | NS | NS | | | | | | |

[z] Percentage data was analyzed after arcsine transformation.
[y] Means in a column with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.
[x] NS: non-significant; **significant at 1% level.

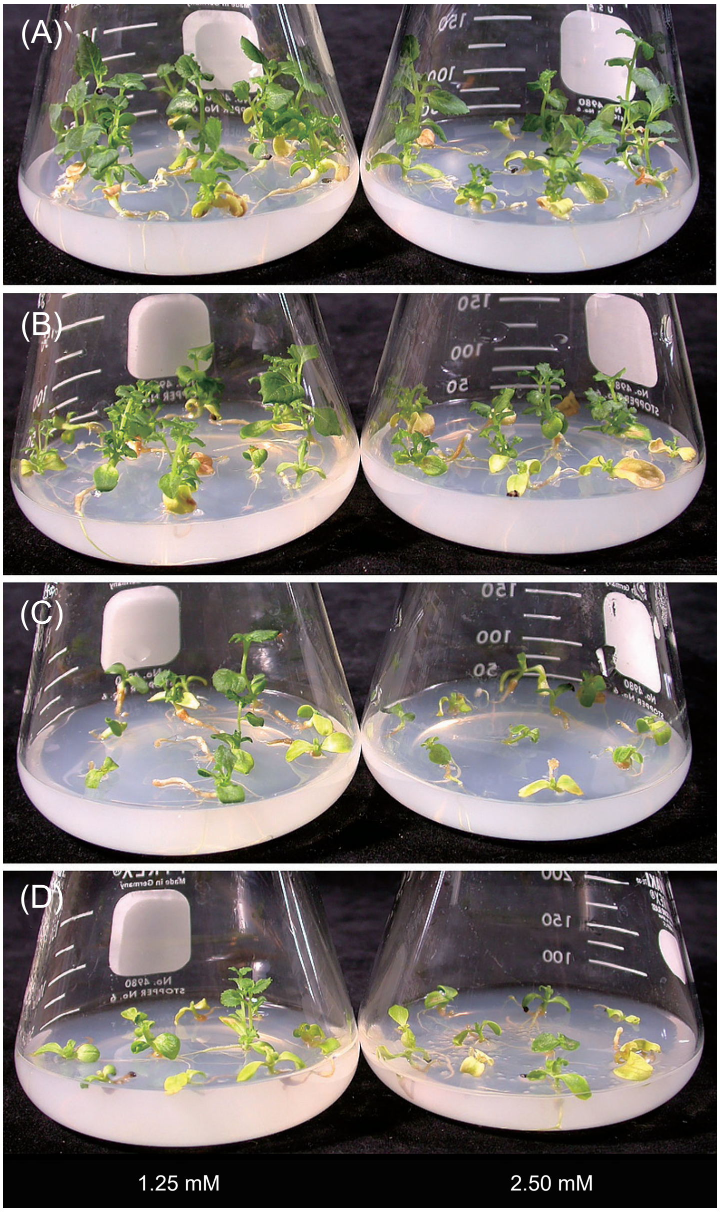


**圖 1.**　離體培養之子葉期桔梗種子苗以兩種秋水仙素濃度處理不同天數後，繼代於基本培養基中生長 4 wk 後之情形。照片左、右側之瓶苗分別源自 1.25 mM 及 2.50 mM 秋水仙素處理，(A)–(D) 依序為 3、6、9 及 12 d 處理時間。

**Fig. 1.**　Growth of cotyledon stage seedling explants of *Platycodon grandiflorum* A. DC. after 4-wk-culture on the colchicine free medium. Explants were derived from various colchicine treatments. Left and right flasks in the same picture was from 1.25 mM and 2.50 mM colchicine, respectively. (A)–(D) explants derived from 3, 6, 9 and 12 d exposure of colchicine, respectively.

但小苗發育時期對存活率的影響並不顯著 (表 2)。4 種處理中以真葉期苗以秋水仙素處理 1 d 的存活率最高，達 100.0%，其次為子葉期苗處理 1 d 或 3 d 的 87.5–91.5%，最低者為真葉期苗經 3 d 處理之 60.0%。以流式細胞儀檢測成活植株之倍體表現，顯示以子葉期苗經

表 2. 不同發育時期之離體培養桔梗種子苗於含有 2.50 mM 秋水仙素之液態培養基中處理不同天數對多倍體誘導之影響。

**Table 2.** Effects of two developmental stage seedling explants in the liquid medium containing 2.50 mM colchicine for various exposure days on polyploidy induction of *Platycodon grandiflorum* A. DC.

| Seedling stage | Treated day | Treated seedling | Survival rate (%)[z] | Examined plant | Ploidy (%) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | 2C | 4C |
| Cotyledon | 1 | 50 | 1.5 ± 5.0 b[y] | 23 | 82.6 | 17.4 |
| | 3 | 50 | 87.5 ± 6.6 b | 9 | 55.6 | 44.4 |
| True leaves | 1 | 50 | 100.0 ± 0.0 a | 23 | 65.2 | 34.8 |
| | 3 | 50 | 60.0 ± 11.3 c | 13 | 61.5 | 38.5 |
| Seedling stage | | | NS[x] | | | |
| Duration | | | ** | | | |
| Seedling stage × Duration | | | ** | | | |

[z] Percentage data was analyzed after arcsine transformation.
[y] Means in a column with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.
[x] NS: non-significant; **significant at 1% level.

秋水仙素處理 1 d 獲得之 4 倍體比率最低，僅 17.4% 外，其餘各處理的 4 倍體比率相近，在 34.8–44.4% 之間。

## 秋水仙素於固態培養基中施用不同時間對不同發育時期培植體多倍體化誘導之影響

同樣使用 2.50 mM 秋水仙素濃度，但於固態再生培養基中處理 3 d 或 6 d，進行多倍體化誘導。結果顯示，種子苗的發育時期、秋水仙素處理天數及兩者間的交感效應，皆對小苗存活率具有顯著影響 ($P < 0.01$) (表 3)。真葉期苗經過秋水仙素處理 3 d 或 6 d 後，仍能保持較高之存活率，在 81.3–86.0% 之間；子葉期苗 3 d 處理組亦具有相似之高存活率，但 6 d 處理組之存活率則下降至 46.7%，是所有處理中最低者。以流式細胞儀檢測成活植株，各種倍體數之圖譜如圖 2 所示。多倍體表現以子葉期苗經 3 d 處理之 64.7% 最高 (58.8% ± 5.9%)，其次為子葉期苗經 6 d 處理之 42.9%，而以真葉期苗經 6 d 處理之 18.5% 最低，各處理組之多倍體比率差異較大。

表 3. 不同發育時期之離體培養桔梗種子苗於含有 2.50 mM 秋水仙素之固態培養基中處理不同天數對多倍體誘導之影響。

**Table 3.** Effects of two developmental stage seedling explants in the solid medium containing 2.50 mM colchicine for various exposure days on polyploidy induction of *Platycodon grandiflorum* A. DC.

| Seedling stage | Treated day | Treated seedling | Survival rate (%)[z] | Examined plant | Ploidy (%) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | 2C | 4C | 8C |
| Cotyledon | 3 | 50 | 82.1 ± 16.4 a[y] | 17 | 35.3 | 58.8 | 5.9 |
| | 6 | 50 | 46.7 ± 12.2 b | 7 | 57.1 | 42.9 | |
| True leaves | 3 | 50 | 86.0 ± 2.8 a | 21 | 66.7 | 33.3 | |
| | 6 | 50 | 81.3 ± 25.7 a | 27 | 81.5 | 18.5 | |
| Seedling stage | | | **[x] | | | | |
| Duration | | | ** | | | | |
| Seedling stage × Duration | | | ** | | | | |

[z] Percentage data was analyzed after arcsine transformation.
[y] Means in a column with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.
[x] ** Significant at 1% level.

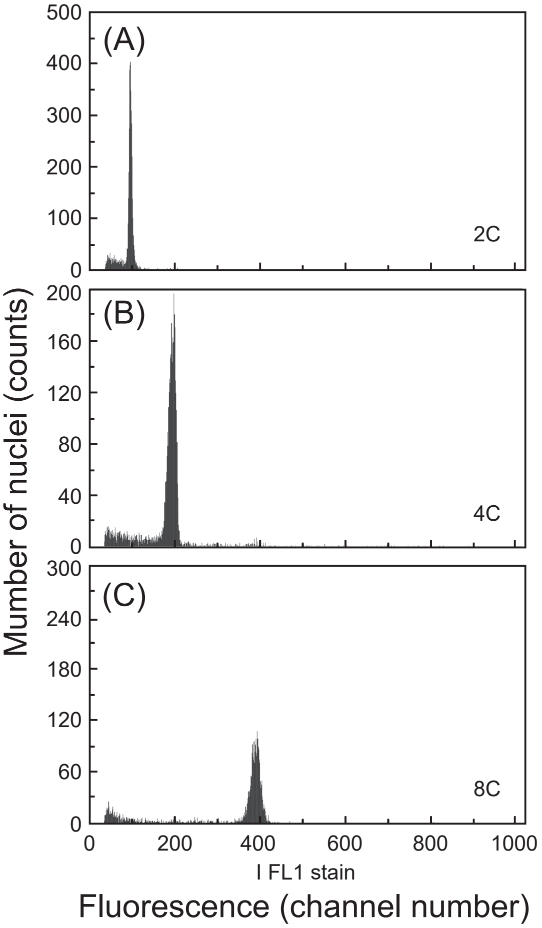


**圖 2.** 秋水仙素處理後之桔梗植株以流式細胞儀檢測之圖譜，每一植株分析 5,000 個細胞。(A) 未處理秋水仙素之對照組 2 倍體植株；(B) 4 倍體植株；(C) 8 倍體植株。

**Fig. 2.** Ploidy of *Platycodon grandiflorum* A. DC. Plants derived from colchicine treatments was analyzed by using flow cytometer. Histogram: Five thousand cells were analyzed for each sample. (A) Control diploid plant without colchicine treating; (B) tetraploid; and (C) octoploid plants.

## 討論

人工誘導多倍體是一種育種使用之工具，多倍體的目的在使植株的營養器官變大、藥用成分提高及抗逆性增強。在圖 3 中，可以看到同一時間播種之 4 倍體雜交桔梗種子於穴盤發芽之情形，大小不一的小苗說明多倍體桔梗的表現相當多樣化，亦說明人工誘導之多倍體桔梗在育種上之應用，仍須透過選拔優良單株與測試雜交組合等傳統育種手段與流程來獲得新品種。因新品種 (系) 育種流程漫長，因此將多倍體桔梗於田間種植表現及選拔結果列為第二階段發表內容，本篇為多倍體桔梗研究之第一部分，主要內容為利用組織培養材料以秋水仙素誘導多倍體桔梗之結果。

影響離體培養方式誘導多倍體的因子眾多，包括使用之藥劑種類、藥劑濃度、處理時間、培植體種類及藥劑之施用方式等 (Dhooghe *et al*. 2011)。本研究中測試的因子，包括有秋水仙素濃度、處理時間、秋水仙素於固態或液態培養基施用，以及不同發育階段之培植體等，相當程度的檢視了以離體培養方式誘導多倍體的各項影響因子。在秋水仙素濃度對培植體存活率的影響方面，本研究比較 1.25 mM 與 2.50 mM 兩種濃度，結果顯示參試之兩種濃度對培植體存活率影響並不顯著 (表 1)。其中，處理 3 d 之存活率兩種濃度依序為 92% 及 88%；但 Wang *et al*. (2006) 以相同濃度與時間處理桔梗莖節培植體，兩種濃度培植體之存活率依序為 30% 及 0%。本研究與 Wang *et al*. (2006) 雖然使用相同之秋水仙素濃度與處理時間，但兩研究之培植體存活率結果呈現相當大之差異，推測原因可能為培植體對秋水仙素的耐受性不同所致，亦即本研究中使用之種子苗培植體可能較莖節培植體對秋水仙素有較高之耐受性。這從本研究種子苗培植體之存活率普遍較高可以看出，且其存活率在秋水仙素濃度提高至 2.50 mM 後亦未呈現明顯下降 (表 1)。在秋水仙素處理時間對培植體存活率的影響方面，可以看到本研究之 3 個試驗中，處理時間皆呈現極顯著之影響，且處理時間與培植體發育階段的交感效應亦極為顯著 (表 1、表 2 及表 3)。在秋水仙素濃度與處理時間的複因子試驗中，處理時間從 3–12 d，結果顯示處理 3–6 d 間，培植體的存活率差異不大，但處理時間超過 6 d 時，存活率明顯下降 (表 1)。而 Wang *et al*. (2006) 以相同濃度 (1.25 mM 與 2.50 mM) 秋水仙素處理桔梗莖節培植體 10–72 h，結果顯示處理時間在 10–40 h 之間時，兩濃度之存活率皆維持在 90% 以上；但處理時間超過 60 h 時，存活率明顯下降至 0–50% 之間。

**圖 3.** 由秋水仙素誘導所得之 4 倍體桔梗其雜交種子於穴盤發芽之情形。

**Fig. 3.** Germination and growth of hybrid seeds from colchicine derived tetraploid plants of *Platycodon grandiflorum* A. DC

比較上述兩研究均採用 1.25–2.50 mM 秋水仙素，但兩研究秋水仙素最佳處理時間則並不相同。一般而言，培植體的存活率，會隨秋水仙素濃度增加與處理時間延長而呈現下降的趨勢 (Yang *et al*. 2006)。比較過去以離體培養方式處理相同濃度 (1.25–2.50 mM) 秋水仙素之研究，發現各研究顯示的最佳處理時間相當分歧，從數小時、數天乃至於數週皆有之。雖然原因往往與培植體的種類及處理之方式有關，但此結果亦顯示，找到針對特定培植體最適合之秋水仙素處理時間，對提高多倍體的誘導效率而言尤為重要 (Tambong *et al*. 1998; Roy *et al*. 2001; Gao *et al*. 2002; Sajjad *et al*. 2013; Kwon *et al*. 2016)。此外，在本研究中除了調查培植體存活率外，亦同時調查了培植體的芽體增殖率，結果顯示濃度與處理時間對芽體增殖率的影響與對培植體存活率的影響，均呈現相同之趨勢。但從表 1 中可以看出，芽體增殖率較培植體存活率更能呈現出不同處理間的差異性，因此建議芽體增殖率可以作為評估秋水仙素處理對培植體影響的指標。

培植體之存活率，主要反應出秋水仙素對培植體的致毒性。在本研究中，存活率調查是於秋水仙素處理完成並繼代至基本培養基中培養 4 wk 後進行，惟表 1、表 2 及表 3 中可以看到，各處理最後得到之成活株數遠低於培植體之存活率。也就是說，早期調查 (處理後 4 wk) 之培植體存活率，並未能正確傳達秋水仙素對培植體長期生長後產生的影響。Kadota & Niimi (2002) 以洋梨 (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui) 芽體培養於 0、0.25 及 2.50 mM 秋水仙素中 1、2、4 及 8 d，並追蹤處理後 2、3 及 4 mo 後之存活率，結果顯示以 0.25 mM 濃度處理 2 d，其 2、3 及 4 mo 後調查之存活率分別為 73.3、53.3 及 53.3%；但以 2.5 mM 濃度同樣處理 2 d，其 2、3 及 4 mo 後之存活率依序為 53.3、6.7 及 0%，且 0.25 mM 濃度處理 8 d 或 2.50 mM 濃度處理 2、4 及 8 d 者，最

後皆無成活植株。以上結果說明，秋水仙素施用濃度較高或施用低濃度但處理時間較長者，對培植體長期生長產生不利之影響。據此，建議早期調查之培植體存活率 (如處理後 4 wk) 不宜太低 (< 60%)，避免因此高估可獲得之植株數，否則在培養後期 (處理後 8 wk 或 12 wk 後)，可能會面臨因培植體停滯生長或逐漸死亡，導致多倍體候選植株太少不利育種工作之進行。換言之，所謂最佳之秋水仙素處理，除具備有較高之多倍體誘導率外，必須同時兼顧培植體的存活率，才能成功獲得較多數量的多倍體候選植株。

Dhooghe *et al*. (2011) 指出影響離體培養誘導多倍體的諸多因子中，以秋水仙素濃度的高低與處理時間的長短，為影響多倍體誘導率的主要因子，且兩因子間具有交感效應。在秋水仙素濃度對於多倍體形成率的影響方面，根據 Dhooghe *et al*. (2011) 的評論報告指出，1.25–2.50 mM 是離體培養誘導多倍體較常使用之濃度。例如 Chakraborti *et al*. (1998) 以離體培養之桑椹 (*Morus alba* L.) 頂芽處理 1.25、2.50 及 5.00 mM 秋水仙素 24 h，其中以 1.25 mM 及 2.50 mM 有較高之 4 倍體誘導率；Hsia *et al*. (2010) 以 0.625–6.250 mM 秋水仙素處理離體培養金線連莖節 3 d，結果顯示以 1.25–2.50 mM 濃度皆可獲得較高之多倍體誘導率。本研究亦採用此一濃度範圍處理桔梗種子苗，各處理中以 2.50 mM 處理 9 d 獲得 66.7% 之 4 倍體比率最高；但若加總其他多倍體 (如 3C 及 6C) 之總多倍體誘導率，則以 1.25 mM 處理 9 d 共獲得 83.3% 多倍體率最高 (表 1)。Wang *et al*. (2006) 以 1.25 mM 與 2.50 mM 秋水仙素處理桔梗莖節培植體，結果以 2.50 mM 處理 40 h 獲得 50% 之 4 倍體為最高。比較上述兩桔梗研究之多倍體誘導比率，仍以本研究較高。

在秋水仙素處理時間對多倍體誘導率的影響方面，本研究顯示多倍體比率在液體培養時會隨著秋水仙素處理時間延長而提高 (表 1、表 2)，在表 1 中顯示處理時間從 3 d 延長至 9 d 對多倍體誘導率有增進作用；但秋水仙素於在固態培養基中施用時，多倍體的比例隨著處理時間從 3 d 延長 6 d 反而下降 (表 3)。此外，在液態培養處理中觀察到除子葉期苗經秋水仙素處理 1 d 之 4 倍體比率較低外，其他各處理之 4 倍體比率差異不大 (表 2)；但在固態培養中，不同發育階段小苗或不同處理天數之多倍體誘導率表現差異較大 (表 3)，顯示秋水仙素於固態或液態培養基中施用之時間對多倍體誘導的影響不盡相同。Peterson *et al*. (2002) 以秋水仙素處理芒草 (*Miscanthus sinensis*) 離體培養有根或無根之芽體，結果顯示有根芽體對秋水仙素的耐受性較低，且嵌合體出現比率較高，推測原因可能為經由根部吸收之秋水仙素在未達成染色體倍加作用前，即已對培植體產生毒害作用。在本研究中以含有秋水仙素之固、液體培養基中處理種子苗，於固體培養基中培養之種子苗其秋水仙素必須完全經由根部吸收；反觀液體培養時，培植體全株浸於培養液中，其秋水仙素吸收途徑較為多元，不一定需經由根部吸收才能到達生長點。綜上推測，培植體在固態培養時，秋水仙素必須經由根部吸收，因此對培植體產生之毒害作用較大，隨著秋水仙素處理時間拉長，對於培植體細胞生長與複製產生的不良影響將更趨嚴重，本研究中秋水仙素於固態培養處理之結果亦顯示有相同現象。

以離體培養方式進行多倍體誘導建議採用分化能力較強的培植體，利用培植體細胞本身具有高度分裂及生長發育的特性來提高多倍體的誘導率 (Peterson *et al*. 2002, 2003; de Carvalho *et al*. 2005; Zeng *et al*. 2006)；除此之外，亦可利用添加植物生長調節劑，活化生長靜止之體細胞後再進行秋水仙素處理，可以提高多倍體植株形成率 (Wang *et al*. 2011)。種子苗具有數量多且生長力旺盛之優點，如 de Carvalho *et al*. (2005) 以胭脂樹 (*Bixa orellana* L.) 無菌播種萌發後 15 d 之種子苗，將其分為子葉培植體及下胚軸培植體進行多倍體誘導。此外，誘導多倍體之目標若是作為育種材料之用，則種子苗較其他離體培養材料更能提供遺傳之多樣性。在本研究中採用無菌播種而來之桔梗小苗作為誘導多倍體之材料，並依其發育階段分為子葉期苗以及真葉期苗加以比較 (表

2、表 3)。從種子苗之發育階段對培植體存活率的影響來看，不同發育階段之種子苗在液態及固態培養中的表現並不相同，雖然兩試驗中使用之秋水仙素濃度相同，但因固態或液態培養基中處理秋水仙素的處理時間並不相同，可能是差異產生的原因之一。但整體來看，真葉期苗對秋水仙素處理具有較高之耐受性 (培植體存活率高)，秋水仙素處理時間延長時，對子葉期苗的影響較大 (固態培養 3 d vs. 6 d)。但其中亦有例外，即就是在液態培養 3 d 時，真葉期苗因葉片數較多，在液體震盪培養中會產生較多的摩擦，導致存活率降低，惟此缺點應可在秋水仙素處理前將葉片先切除而予以克服。以種子苗發育階段對多倍體的誘導效率的影響來看，在液態培養中除在子葉期苗處理 1 d 時較低外，其他各處理之多倍體誘導率差異不大，種子苗發育階段的影響並不顯著；但在固態培養因處理時間較長 (3 d 或 6 d)，對不同發育階段的種子苗產生明顯之影響，其中以子葉期苗較真葉期苗具有較佳的多倍體誘導率，說明培植體材料的生理狀態對於多倍體誘導效率具有一定的影響力。比較不同發育階段之培植體對多倍體誘導影響的研究甚少，Hsia *et al*. (2009) 以台灣金線連 (*Anoectochilus formosanus* Hayata) 無菌播種不同週齡之根莖 (rhizome) 作為培植體進行多倍體誘導，發現從無菌播種而來之根莖具有很好的分化能力，且採用適當根齡之根莖作為培植體可提高多倍體誘導的比率，顯示選擇適當發育階段或生理狀態較佳之培植體可以提高多倍體誘導率。

綜合本研究之結果，顯示使用無菌播種之種子苗作為誘導多倍體之材料，培植體的生長發育階段、秋水仙素處理時間，以及秋水仙素以固態或液態方式處理等因子，不僅會影響培植體的存活率，同時亦影響多倍體的誘導率。建議以展開 2 片子葉之桔梗種子苗為培植體，在含有 1.25 mM 秋水仙素之液態培養基中處理 6 d，或於含有 2.50 mM 秋水仙素之固態培養基中處理 3 d，可獲得高於 80% 之培植體存活率，且多倍體誘導率在 60% 以上。

## 引用文獻


Acquah, G. 2007. Principles of Plant Genetics and Breeding. Blackwell Publishing, Malden, MA. 584 pp.

de Carvalho, J. F. R. P., C. R. de Carvalho, and W. C. Otoni. 2005. *In vitro* induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana*). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 80:69–75.

Chakraborti, S. P., K. Vijayan, B. N. Roy, and S. M. H. Qadri. 1998. *In vitro* induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). Plant Cell Rep. 17:799–803.

Dhooghe, E., K. Van Laere, T. Eeckhaut, L. Leus, and J. Van Huylenbroeck. 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 104:359–373.

Gao, S. L., B. J. Chen, and D. N. Zhu. 2002. *In vitro* production and identification of autotetraploids of *Scutellaria baicalensis*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 70:289–293.

Hsia, C. N., J. T. Huang, U. C. Chen, C. Y. Tsao, S. H. Liang, and S. S. Tsay. 2009. *In vitro* induction of polyploidy from rhizomes of *Anoectochilus formosanus*. J. Taiwan Agric. Res. 58:302–309. (in Chinese with English abstract)

Hsia, C. N., J. T. Huang, U. C. Chen, C. Y. Tsao, S. H. Liang, and S. S. Tsay. 2010. *In vitro* induction of polyploidy from nodal explants of *Anoectochilus formosanus*. J. Taiwan Agric. Res. 59:165–176. (in Chinese with English abstract)

Kadota, M. and Y. Niimi. 2002. *In vitro* induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui). Plant Cell Rep. 21:282–286.

Kwon, S. J., D. Y. Seo, G. Y. Cho, M. S. Lee, Y. J. Moon, H. O. Boo, S. H. Woo, and H. H. Kim. 2016. Effect of colchicine on chromosome doubling in *Codonopsis lanceolata*. Korean J. Plant Res. 29:347–354.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473–497.

Nyakudya, E., J. H. Jeong, N. K. Lee, and Y. S. Jeong. 2014. Platycosides from the roots of *Platycodon grandiflorum* and their health benefits. Prev. Nutr. Food Sci. 19:59–68.

Petersen, K. K., P. Hagberg, K. Kristiansen. 2002. *In vitro* chromosome doubling of *Miscanthus sinensis*. Plant Breed. 121:445–450.

Petersen, K. K., P. Hagberg, and K. Kristiansen. 2003. Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 73:137–146.

Roy, A., G. Leggett, and A. Koutoulis. 2001. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Cell Rep. 20:489–495.

Sajjad, Y., M. J. Jaskani, A. Mehmood, I. Ahmad, and H. Abbas. 2013. Effect of colchicine on *in vitro* polyploidy induction in African marigold (*Tagetes erecta*). Pak. J. Bot. 45:1255–1258.

Tambong, J. T., V. T. Sapra, and S. Garton. 1998. *In vitro* induction of tetraploids in colchicine-treated cocoyam plantlets. Euphytica 10:191–197.

Wang, X. H., X. Li, Y. H. Qu, J. Yang, and Z. J. Gu. 2006. The polyploid induction and identification of *Platycodon grandiflorus* (Campanulaceae) in China. Acta Bot. Yunnanica. 28:593–598. (in Chinese with English abstract)

Wang, X. L., J. X. Zhou, M. D. Yu, Z. G. Li, X. Y. Jin, and Q. Y. Li. 2011. Highly efficient plant regeneration and *in vitro* polyploidy induction using hypocotyl explants from diploid mulberry (*Morus multicaulis* Poir.). *In Vitro* Cell. Dev. Biol.–Plant 47:434–440.

Xu, B. J., Y. N. Zheng, and C. K. Sung. 2004. Quality control and evaluation of *Platycodon grandiflorum*: Implications for future management. Nat. Prod. Sci. 10:141–151.

Yang, X. M., Z. Y. Cao, L. Z. An, Y. M. Wang, and X. W. Fang. 2006. *In vitro* tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Euphytica 152:217–224.

Zeng, S. H., C. W. Chen, H. Liu, J. H. Liu, and X. X. Deng. 2006. *In vitro* induction, regeneration and analysis of autotetraploids derived from protoplasts and callus treated with colchicine in *Citrus*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 87:85–93.

Zhou, C. E., S. X. Lu, Y. Q. Zhou, and F. P. Gu. 2008. Research progress on the polyploid breeding of medicinal plants by artificial inducement. J. Anhui Agri. 33:14600–14601. (in Chinese with English abstract)

# Factors of Colchicine Treatments on Polyploidy Induction by Using *in Vitro* Seedlings of *Platycodon grandiflorum*

Chi-Ni Hsia[1,*], Uei-Chern Chen[2], and Chin-Yi Tsao[3]

## Abstract

Hsia, C. N., U. C. Chen, and C. Y. Tsao. 2019. Factors of colchicine treatments on polyploidy induction by using *in vitro* seedlings of *Platycodon grandiflorum*. J. Taiwan Agric. Res. 68(3):215–225.

Plants of *Platycodon grandiflorum* A. DC. are vastly used as traditional Chinese medicine. However, breeding of elite varieties by hybridization has been less effective because of lacking diverse genetic resources in this species. It is thought to produce polyploidy by using colchicine that could create novel genetic resources for breeding purposes. This study was conducted to investigate effects of colchicine concentration, exposure duration and colchicine used in the liquid or the solid medium on polyploidy induction by using *in vitro* seedlings of *P. grandiflorum* in different developmental stages. Ploidy of survival plantlets derived from colchicine treatments was analyzed by using a flow cytometer. Results showed that both exposure duration of colchicine and its interaction with developmental stage of seedlings had significant effects on the survival rate of explants. The best treatments with explant survival rate higher than 80% and polyploidy induction rate more than 60% were obtained either from 1.25 mM colchicine in liquid medium for 6 d exposure or from 2.50 mM colchicine in solid medium for 3 d exposure by using cotyledon stage seedlings as explants.

**Key words:** Jiegeng, Ploidy, Tetraploid, Colchicine, *In vitro*.

Received: July 9, 2018; Accepted: March 14, 2019.

[*] Corresponding author, e-mail: hsia@tari.gov.tw
[1] Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Contract Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 68(3):226–236 (2019)
DOI:10.6156/JTAR.201909_68(3).0004 研究報告

# 由嗜菊短頭脊沫蟬泡沫液中分離之拮抗細菌對植物病原真菌之抑菌效用

張淑貞[1] 石憲宗[2] 蔡志濃[3] 林宗俊[4] 路光暉[5,*]

## 摘要

張淑貞、石憲宗、蔡志濃、林宗俊、路光暉。2019。由嗜菊短頭脊沫蟬泡沫液中分離之拮抗細菌對植物病原真菌之抑菌效用。台灣農業研究 68(3):226–236。

沫蟬若蟲的泡沫液在田間未見有真菌發霉現象，據此觀察，由台灣的嗜菊短頭脊沫蟬 [*Poophilus costalis* (Walker, 1851)] 之泡沫液分離拮抗細菌，並針對此類細菌進行對植物病原真菌生長之抑制效果及幾丁質酶活性分析。本研究由沫蟬泡沫液中分離出 2 種細菌對豌豆鐮孢菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*) 與芒果炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) 之生長有明顯抑制作用，並經由 16S rDNA 及幾丁質酶基因序列鑑定 AY 與 DT 分別為 *Stenotrophomonas maltophilia* 與 *Delftia tsuruhatensis*。其中已確認 *S. maltophilia* AY 可產生外幾丁質酶：N-乙醯葡萄糖胺酶與幾丁二醣酶，以及內幾丁質酶，其比活性各為 1.1、19.9 及 19.1 nmol *p*-nitrophenol min$^{-1}$ mg$^{-1}$ protein。這 2 種拮抗細菌未來在植物病害防治上具有發展潛力。

**關鍵詞**：*Stenotrophomonas maltophilia*、*Delftia tsuruhatensis*、幾丁質酶、抑制真菌效用。

## 前言

沫蟬總科 (Cercopoidea) 昆蟲，因其若蟲會分泌泡沫 (froth) 包覆全身而得名。此泡沫液已證實由馬氏管 (Malpighian tubules) 分泌之蛋白質、醣類，再加上其腸道排出之液狀排泄物混和，由肛門排出。此液體在流至腹面的尾附器 (caudal appendages)，與腹部第 7–8 腹節之皮下黏液腺體 (the glands of Batelli) 所分泌的黏液混合，並藉由腹節的前後伸縮形成泡沫 (Guilbeau 1908; Marshall 1966, 1973; Mello *et al*. 1987)。

嗜菊短頭脊沫蟬 [*Poophilus costalis* (Walker, 1851)] 屬於半翅目 (Hemiptera) 沫蟬總科 (Cercopoidea)、尖胸沫蟬科 (Aphophoridae) 之短頭脊沫蟬屬 (*Poophilus*)，其若蟲具有產生泡沫液包覆全身之行為 (Ajayi & Oboite 2000; Shih & Yang 2002)。這類泡沫液在田間複雜環境下，並未見有真菌發黴的現象，推測此抑制真菌生長的原因可能來自小分子物質、蛋白質或微生物。柳尖胸沫蟬 (*Aphophora costalis*) 若蟲的泡沫液中，已證實含有幾丁質酶 (chitinase) 及蛋白質酶 (protease)，具有抑制真菌生長之潛力 (Maksyutova *et al*. 1999)。嗜菊短頭脊沫蟬若蟲的泡沫液中，更進一步確認有外幾丁質酶 (exochitinase)，包括 N-乙醯葡萄糖胺酶 (β-N-actylglucosaminidase)、幾丁二醣酶 (chitobiosidase) 及內幾丁質酶 (endochitinase)，且已證實若蟲泡沫液可抑制豌豆鐮孢菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*) 的生長 (Chang *et al*. 2019)。

投稿日期：2018 年 6 月 21 日；接受日期：2019 年 3 月 25 日。
* 通訊作者：khlu@dragon.nchu.edu.tw
[1] 農委會農業試驗所應用動物組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所應用動物組副研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[5] 國立中興大學昆蟲學系教授。台灣 台中市。

大部分真菌的細胞壁有幾丁質，由 β-1,4-N-acetylglucosamine 聚合而成，可被幾丁質酶水解。已知有多種微生物可分泌幾丁質酶，並被應用於真菌之生物防治 (Zhang & Yuen 2000; Zhang *et al*. 2001; Prasannakumar *et al*. 2015)。為更進一步瞭解普遍分布於台灣之嗜菊短頭脊沫蟬若蟲泡沫液之抑菌應用潛力，擬篩選其泡沫液中可抑制真菌之微生物，並進一步分析其幾丁質酶活性與其抑制真菌生長之關係，探究其抑制真菌生長之原因。

# 材料與方法

## 供試蟲源及真菌病原

由於嗜菊短頭脊沫蟬目前尚無法於實驗室中完成繼代繁殖，故本研究所需蟲源皆採自屏東縣長治鄉及麟洛鄉的竹仔菜 (*Commelina diffusa* Burm. f.)、大花咸豐草 (*Bidens pilosa* L. var. *radiata* Sch.) 及銀膠菊 (*Parthenium hysterophorus* L.) 上。採得之沫蟬若蟲皆飼養於室內插於水瓶中已發根之竹仔菜上。

病原真菌豌豆鐮孢菌購自新竹食品工業研究所菌種保存中心 (BCRC 35290)。芒果炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) 則分離自台南市官田區罹病芒果。試驗前先將此 2 菌株之菌絲置於直徑 9 cm 含馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 (potato dextrose agar; PDA) 中，置於定溫 25℃ ± 1℃暗室中，豌豆鐮孢菌在 4 d 後以直徑 8 mm 打孔器取下菌落邊緣新生長之菌絲塊，芒果炭疽病菌則在培養 8 d 後取邊緣菌絲塊，以供真菌抑制力試驗所需。

## 寄主植物之栽培

在溫室種植竹仔菜，每週施用一次複合肥料必達 (20N-20P-20K, Scotts, OH, USA)。待竹仔菜生長至 20–30 cm 長，剪取末端 20 cm 攜回實驗室後插於水瓶中，待 7 d 發根後，置於含複合肥料必達之水瓶內，成長的植株即可供飼育沫蟬若蟲。

## 沫蟬泡沫狀分泌物中之細菌分離

將採自野外之沫蟬 4–5 齡若蟲，以無菌水清洗蟲體後，飼養於竹仔菜上，隔天再以無菌水清洗蟲體及竹仔菜。再飼養隔夜後，以秤藥勺舀約 0.5 $mm^3$ 沫蟬分泌之泡沫液，塗佈於 lysogeny broth (LB) 培養基 37℃培養隔夜，觀察菌落外型。再挑出單一菌落置於 1 mL LB 培養液、37℃、200 rpm 震盪培養隔夜。

## 拮抗細菌的篩選

### 與豌豆鐮孢菌之對峙培養

以移殖環分別沾取供試菌液塗劃線於直徑 9 cm 之 PDA 培養基左端，距菌液 5 cm 處，培養基右端則置一豌豆鐮孢菌之菌絲塊後，置於 25℃定溫箱中。對照組則以 LB 培養液取代菌液。每日觀察至對照組之豌豆鐮孢菌長滿培養基、拍照。每處理各 4 重複。測試後將具有拮抗效果的菌株，進一步劃線平板，挑取單一菌落，獲得該拮抗細菌的分離株。

### 與芒果炭疽病菌之對峙培養

取上述對豌豆鐮孢菌抑制效果最好之 AY 菌進一步分離出 10 個菌落，改與芒果炭疽病菌進行對峙培養，挑出其中抑制芒果炭疽病菌最好的 2 個菌落 AY-1、AY-7，再與 DT 菌同時進行對芒果炭疽病菌的對峙培養。各取 30 μL 菌液置於 PDA 培養基左端直徑 8 mm 濾紙上，距此濾紙 5 cm 處、培養基右端置一芒果炭疽病菌之菌絲塊，置於 25℃定溫箱中。對照組則以 LB 培養液取代菌液。每日觀察至對照組之芒果炭疽病菌長滿培養基，拍照、量測菌絲生長距離並計算其抑制率，各 5 重複。抑制率：(對照組菌絲塊中心點至菌絲生長最遠距離 − 處理組菌絲塊中心點至菌絲生長最遠距離)/對照組菌絲塊中心點至菌絲生長最遠距離 × 100%。並以 SAS Enterprise Guide 7.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA) 先進行變方分析，再以 least significant difference (LSD) 法比較各組菌絲長度與抑制率的差異，並採 $P < 0.05$ 顯著水準比較處理間平均值之差異。

## 細菌之分離及 16S rDNA 鑑定分析

取上述有明顯抑菌效果之細菌 AY、DT 菌液，以劃線於 LB 培養基平板上，將平板置於 25℃細菌培養箱中，經培養 72 h 後觀察並

拍照記錄。另將菌液以劃線於 LB 培養基，37℃培養隔夜後，挑出單一菌落置於 1 mL LB 培養液。經 37℃隔夜培養，再取出菌液以 Tissue & Cell Genomic DNA Purification Kit (GeneMark, Taichung, Taiwan) 萃取 DNA，最後可得 200 µL DNA 溶液，詳細流程同試劑的使用說明。參考 Weisburg *et al*. (1991) 設計之細菌 16S DNA 通用引子組 fD1/rD1，縮減序列為 fD1-S/rD1-S (表 1)，以此對引子進行 polymerase chain reaction (PCR) 增幅其部分 16S rDNA 片段。以 2× PCR Master Mix–SuperTherm 試劑組 (JMR, Stourbridge, UK) 進行 PCR，每一反應總體積為 20 µL，包含 2 µL 細菌 DNA 溶液，10 µL 之 2× PCR Master Mix (內含 2 U SuperTherm DNA polymerase Mix、2× buffer、400 µM dNTPs、3 mM $MgCl_2$)，以及引子組 fD1-S/rD1-S 各 10 pmol，不足體積以無菌水補足至 20 µL。PCR 增幅以 Perkin-Elmer 公司 (Waltham, MA, USA) 的 GeneAmp® PCR System 2400 迴溫循環器進行，於 94℃ 1 min、60℃ 1 min、72℃ 2 min；隨即進行 94℃ 20 s、60℃ 20 s、72℃ 20 s，30 個循環；最後以 72℃ 7 min 使反應完全。電泳後，切取增幅之主要片段，續以 TOPO TA cloning kit (Invitrogen, CA, USA) 選殖此段基因。將此增幅的 PCR 產物接入 pCR® II-TOPO® 載體後，轉形至 DH5α 勝任細胞 (GeneMark, Taichung, Taiwan) 中，再委請源資國際生物科技股份有限公司 (Tri-I Biotech Inc., New Taipei, Taiwan) 以自動定序儀 (ABI 3730) 進行定序。每種細菌各取 3 個菌落，進行雙向定序。另外，因此片段序列長約 1.5 kb，故再根據已解序之片段，選取不同細菌之共同序列，並參考 Carvalho *et al*. (2008) 的報告，以 16SF2/16SR2 (表 1) 進行此片段中間序列的 PCR 及定序。將所有所得序列再以 Vector NTI® Suite 11.0 軟體 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 之 Contig-Express™ 程式進行整理。

進一步將這些序列在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 網站上，以 BLAST 程式進行相似序列檢索，下載相近序列後，以 Vector NTI® Suite 9.0 軟體之 AlinX® 程式進行多序列比對分析。選取這些序列的共同區域，以 ClustalW2 進行多序列排比，再以 PHYLIP 3.6 進行親緣關係推衍，繪出 neighbor-joining tree，繼之以 bootstrap analysis 做 1,000 次統計分析，評估此親緣關係樹各分枝間之信賴度。

## 細菌幾丁質酶基因

依據細菌 *Aeromonas caviae* (GenBank CAD24484)、*Shewanella baltica* (GenBank AF193506)、*Stenotrophomonas maltophilia* (GenBank AEM52154) 之幾丁質酶胺基酸共有序列設計簡併引子對 AC1/AC2 (表 1)，此引子對位置在 *A. caviae* 幾丁質酶胺基酸序列 307–314 的 FDGVDIDW 與 444–451 的 YGRGMTGV。以此引子組增幅細菌 DNA 溶液，PCR 及定序方法同上，僅 PCR 循環改為 94℃ 2 min、60℃ 1 min、72℃ 2 min；隨即進行 94℃ 30 s、60℃ 30 s、72℃ 20 s，30 個循環；最後 72℃ 7 min 使反應完全。

**表 1.** 本研究中增幅與定序基因所使用的引子。

**Table 1.** Oligonucleotide primers used for amplification and sequencing of genes in this study.

| Primer | Nucleotide sequence (5’ to 3’) | Gene | Amplicon (bp) |
|---|---|---|---|
| fD1-S | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG | 16S rDNA | 1,526–1,537 |
| rD1-S | AAGGAGGTGATCCAGCC | | |
| 16SF2 | ACTCCTACGGGAGGCAGCAG | 16S rDNA | 734–779 |
| 16SR2 | AGGGTTGCGCTCGTTG | | |
| AC1[z] | TTYGAYGGNGTDGAYATHGAYTGG | Chitinase | 378 |
| AC2[z] | HACNCCDGTCATNCCDCGNCCRTA | | |

[z] IUPAC code: The International Union of Pure and Applied Chemistry code (Johnson 2010).

### 細菌幾丁質酶活性

參考 Zhang *et al*. (2001) 方法修改如下，取上述有明顯抑菌效果之細菌 AY2 菌液塗劃於 tryptic soy agar (TSA) 培養基、25℃培養 24 h，刮下菌體回溶於 phosphate buffered saline (PBS) buffer 中，測量 600 nm 的吸光值、計算菌液濃度。取出 $1.25 \times 10^9$ colony forming units (CFU)，加入內含 1 g 膠狀幾丁質的 100 mL basic broth medium (BBM) broth，30℃、180 rpm 培養 60 h。以 10,000× *g* 在 4℃離心 10 min。取上清液在室溫中加入上清液體積 85% 的硫酸銨 (ammonium sulfate) 沉澱蛋白質，攪拌 60 min。續以 10,000× *g* 在 4℃離心 15 min，再以 5 mL 20 mM pH 8.0 含 1 mM PMSF 的 Tris-HCl buffer 回溶沉澱物，並改置沉澱液於 12–14 kDa 的透析膜中 (Spectra/Por®, Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA)。續以此 buffer 800 mL 在 4℃透析 1 d，並以 10,000× *g* 離心 15 min，重複透析 4 次。最後，將上清液以 Amicon ultra 10K (Millipore, Bedford, MA, USA) 濃縮，並換成 PBS buffer，此即為細菌萃取液。

取上述細菌萃取液，參考 Nawani *et al*. (2002) 及 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, MS, USA) Citinase assay kit (CS0980) 之使用說明，分別分析其 2 種外幾丁質酶 N-乙醯葡萄糖胺酶與幾丁二醣酶，以及 1 種內幾丁質酶活性。各以其模式受質 4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide、4-Nitropheny N,N’-diacetyl-β-D-chitobioside 及 4-Nitropheny β-D-N,N’,N’’-triacetylchitotriose 20 μL 分別與待測物細菌萃取液 20 μL，於 37℃反應 30 min，再加入 0.4 μM sodium carbonate 80 μL 終止反應，於 405 nm 測吸光值。另取 *p*-nitrophenol 0.01 $\mu mol\ mL^{-1}$ 120 μL，置於 37℃、30 min 後，以 405 nm 測吸光值，作為幾丁質酶活性計算的參考值。並以 Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 進行蛋白質定量。最後結合活性及蛋白質定量結果，計算此細菌萃取液之幾丁質酶比活性。

## 結果

### 由沫蟬泡沫液分離之細菌與病原真菌之對峙培養

由沫蟬泡沫液中，以 LB 培養基分離得 4 個菌落 AY、DT、W3、W4，將此 4 個菌落各與豌豆鐮孢菌在 PDA 培養基上進行對峙培養。AY 菌落為淺黃色，DT、W3、W4 菌落則為白色 (圖 1)。AY 菌落明顯抑制豌豆鐮孢菌生長，接種後分別於 13 d、24 d 皆有顯著抑菌效果；DT 菌落為乳白色，抑菌效果稍弱；其餘 W3、W4 菌落則無明顯抑菌效果 (圖 1)。

將對豌豆鐮孢菌生長有明顯抑制效果之 AY 菌，再進一步分離出 10 個菌落，改與芒果炭疽病菌進行對峙培養，此 10 個菌落對芒果炭疽病菌的抑制效果略有差異。挑出其中抑制芒果炭疽病菌最好的 2 個菌落 AY-1、AY-7，並與 DT 菌落同時進行對芒果炭疽病菌的對峙培養，其抑制情形如圖 2，芒果炭疽病菌絲生長距離如表 2 所示。對照組的芒果炭疽病菌絲生長距離，皆顯著長於被此 3 菌落抑制的芒果炭疽病菌絲長度，差異極顯著。此 3 菌落 AY-1、AY-7、DT 皆對芒果炭疽病菌有明顯抑制效果，抑制率如表 2。AY-1、AY-7 菌落間抑制的芒果炭疽病菌絲長度及抑制率差異皆不明顯，DT 對芒果炭疽病菌的抑制力顯著較前 2 菌落差 (表 2)。

### 細菌外觀與 16S rDNA

對豌豆鐮孢菌或芒果炭疽病菌有抑制效果的細菌 AY 與 DT，經 25℃、72 h 培養於 LB 培養基後，細菌 AY 菌落呈黃色，細菌 DT 菌落呈乳白色、菌落邊緣有一透明圈 (圖 3)。

以引子對 fD1-S/rD1-S 增幅細菌部分核糖體 16S rDNA，PCR 產物電泳後各可見一約 1,500 bp 長度的片段。將此片段回收、轉殖並定序，AY 細菌定序得 1,500 bp 並已登錄到 NCBI 基因庫 (GenBank MH478205)，與中國大陸、菲律賓、英國的 *S. maltophilia* (GenBank GQ267817、JF729305、LT906480) 序列 100% 相同。DT 細菌之部分片段 16S rDNA 1,488 bp 亦已登錄到 NCBI 基因庫 (GenBank

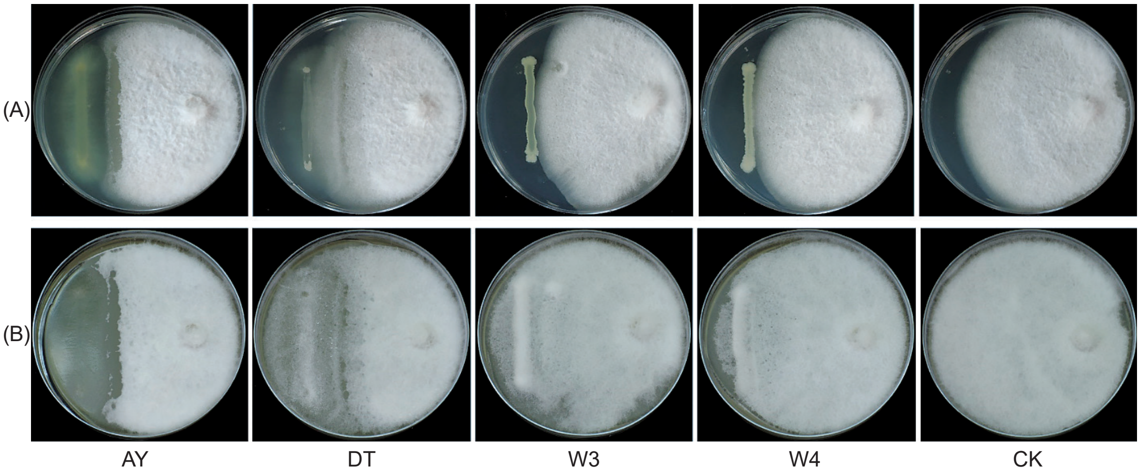


**圖 1.** 由沫蟬泡沫狀分泌物中分離出之細菌 (培養皿左方) 對植物病菌豌豆鐮孢菌 (培養皿右方) 在 PDA 培養基、25℃培養 13 d (A 列)、24 d (B 列) 之抑菌效果。

**Fig. 1.** Screening of antagonistic bacteria from the froth of spittlebug *Poophilus costalis* against plant pathogenic fungi *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* on potato dextrose agar (PDA) medium, 13 d (A row) and 24 d (B row) after incubated at 25℃.

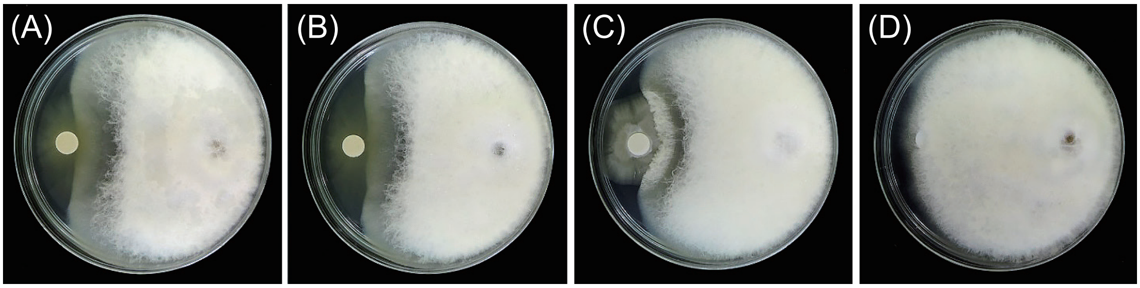


**圖 2.** 由沫蟬泡沫狀分泌物中分離出之拮抗菌 *Stenotrophomonas maltophilia* AY-1、AY-7 與 *Delftia tsuruhatensis* DT 對芒果炭疽病菌在 PDA 培養基上接種 12 d 後之抑制效果。培養基的左方接種拮抗菌或 LB 培養液：(A) AY-1；(B) AY-7；(C) DT；(D) 對照組 LB 培養液；右方接種芒果炭疽病菌。

**Fig. 2.** Antifungal effect of antagonistic bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from the froth of spittlebug *Poophilus costalis* against plant pathogenic fungi *Colletotrichum gloeosporioides* on potato dextrose agar (PDA) medium, 12 d after incubated at 25℃. Left side of plate: (A) AY-1; (B) AY-7; (C) DT; and (D) Control, lysogeny broth (LB) broth. Right side of plate: *Colletotrichum gloeosporioides*.

MH478206)，其與中國大陸、法國、美國的 *Delftia tsuruhatensis* (GenBank AY302438、CP017420、KC572558) 序列皆 100% 相同。

由 AY 細菌在 LB、PDA 培養基上的菌落外觀與 *S. maltophilia* 之高度相似，以及 16S rDNA 序列與中國大陸、菲律賓、英國的 *S. maltophilia* 序列 100% 相同，推論此 AY 細菌應為 *S. maltophilia*。另由 DT 細菌在 LB、PDA 培養基上的菌落外觀與 *D. tsuruhatensis* 之高度相似，以及 16S rDNA 序列與中國大陸、法國、美國的 *D. tsuruhatensis* 序列皆 100% 相同，推論此 DT 細菌應為 *D. tsuruhatensis*。

進一步比較 AY、DT 細菌 16S rDNA 與 NCBI 基因庫上相近序列的親緣關係，選取這些序列的共同區域，即相當於 *S. maltophilia* AY 第 71–1,439 bp。以細菌 *Chryseobacterium ginsengisoli* (AB245373) 為外群，繪出 neighbor-joining tree (圖 4)。顯示 *S. maltophilia* 歸

**表 2.** 由沫蟬泡沫狀分泌物中分離出之拮抗菌 *Stenotrophomonas maltophilia* AY-1、AY-7 和 *Delftia tsuruhatensis* DT 對芒果炭疽病菌在馬鈴薯培養基上之生長抑制效果。

**Table 2.** Antifungal effect of antagonistic bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* AY-1, AY-7 and *Delftia tsuruhatensis* DT isolated from the froth of spittlebug *Poophilus costalis* against plant pathogenic fungi *Colletotrichum gloeosporioides* on potato dextrose agar.

| Antifungal effect | Control | AY-1 | AY-7 | DT |
|---|---|---|---|---|
| Radial growth of fungi (cm)[z] | 6.66 ± 0.05 a | 3.48 ± 0.11 c | 3.50 ± 0.12 c | 4.74 ± 0.05 b |
| Inhibition (%)[y] | - | 47.70 ± 1.80 a | 47.70 ± 2.10 a | 28.80 ± 0.60 b |

[z] Mean ± standard error (*n* = 5). Means of length followed by the different letters are significantly different between bacteria at 5% level by least significant difference (LSD) test.

[y] Inhibition rate (%) = (R–r)/R. R is the radial growth of fungal mycelia on the control plate and r is the radial growth of fungal mycelia interacting with antagonistic bacteria. Mean ± standard error (*n* = 5). Means of inhibition followed by the different letters are significantly different between bacteria at 5% level by LSD test.

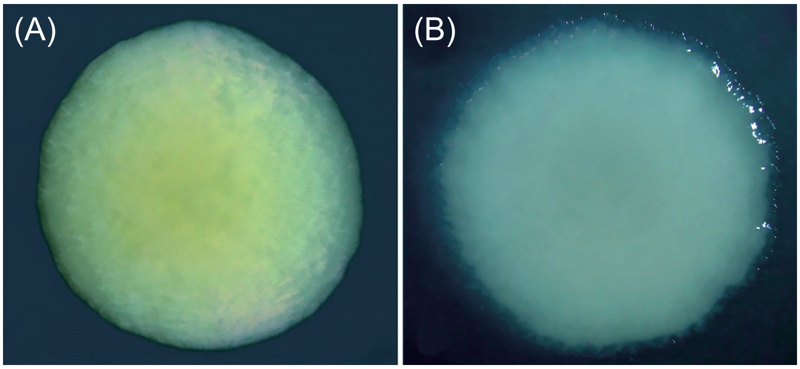


**圖 3.** 由沫蟬泡沫狀分泌物中分離出之拮抗菌 *Stenotrophomonas maltophilia* AY (A) 與 *Delftia tsuruhatensis* DT (B) 培養於 LB 培養基。

**Fig. 3.** Antagonistic bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* AY (A) and *Delftia tsuruhatensis* DT (B) were isolated from the froth of spittlebug *Poophilus costalis* and grown on lysogeny broth (LB) medium.

納成同一群，其 bootstrap value 為 100，其中 AY 細菌與大陸的 *S. maltophilia* 關係最接近，bootstrap value 為 92。*D. tsuruhatensis* DT 自成一群，其 bootstrap value 為 75。

## 細菌幾丁質酶基因與活性

進一步以自行設計之細菌幾丁質酶簡併引子組 AC1/AC2 增幅 AY 細菌之 DNA，可增幅得一明顯片段，定序得 378 bp。以此序列在 NCBI 網站中 BLAST 搜尋，可知其與 NCBI 資料庫中分離自中國大陸廢水的 *S. maltophilia* CP072562、土壤的 *S. maltophilia* CP015612 及來自澳洲廢水分離而得之 *S. maltophilia* CP028899 序列各有 4 bp 不同，與來自英國、西班牙臨床病例分離而來的 *S. maltophilia* AM743169、HE798556 各有 6、7 bp 不同，與來自泰國的 *S. maltophilia* AF047411 有 11 bp 不同。

取上述有明顯抑菌效果且已確認有幾丁質酶基因的細菌 *S. maltophilia* AY，分析其幾丁質酶活性，其 2 種外幾丁質酶 N- 乙醯葡萄糖胺酶與幾丁二醣酶及 1 種內幾丁質酶比活性各為 1.1、19.9 及 19.1 nmol *p*-nitrophenol $min^{-1}$ $mg^{-1}$ protein。可見此細菌分泌之外幾丁質酶 N-乙醯葡萄糖胺酶比活性最低，其餘二者相近。以此細菌 109 CFU 細菌數，30℃培養 60 h 後，其比活性各為 2.6、45.3、43.5 nmol *p*-nitrophenol $min^{-1}$ $mg^{-1}$ protein，以外幾丁質酶之幾丁二醣酶比活性高，內幾丁質酶次之，外幾丁質酶之 N-乙醯葡萄糖胺酶最低 (表 3)。

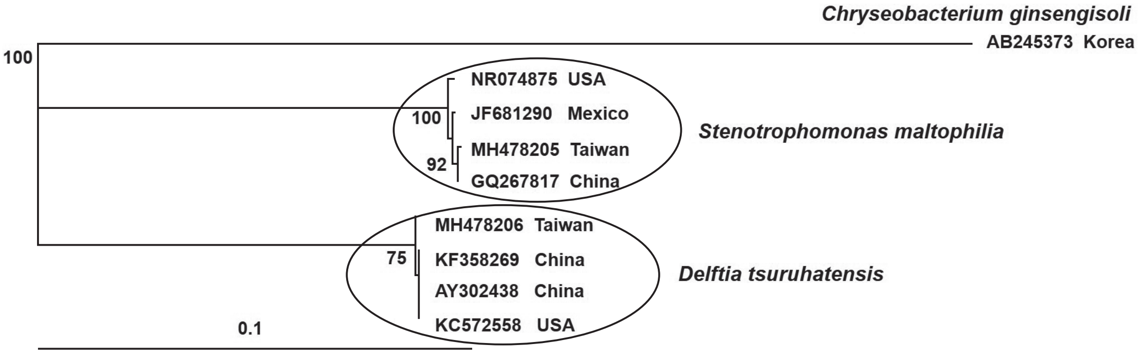


**圖 4.** 拮抗菌 *Stenotrophomonas maltophilia* 與 *Delftia tsuruhatensis* 之 16S rDNA 片段序列，以 Kimura 2-parameter 運算模式，再經 neighbor-joinging 群聚方法所推導之親緣關係樹。樹形上的數值為經 1,000 次 bootstrap 的值，> 70% 才會顯示其上。

**Fig. 4.** A phylogenetic tree of antagonistic bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* and *Delftia tsuruhatensis* based on the 16S rDNA sequences by neighbor-joining method of pairwise distance model of Kimura 2-parameter. Bootstrap values > 70% are indicated at the nodes (bootstrap analysis 1,000 replicates).

**表 3.** 由沫蟬泡沫液中分離出之 *Stenotrophomonas maltophilia* AY 細菌之幾丁質酶活性。

**Table 3.** Chintinase activity of *Stenotrophomonas maltophilia* AY isolated from the froth of spittlebug *Poophilus costalis*.

| *S. maltophilia* | β-N-actylglucosaminidase | Chitobiosidase | Endochitinase |
|---|---|---|---|
| Unit[z] $mg^{-1}$ protein | 1.1 | 19.9 | 19.1 |
| Unit[z] $10^{-9}$ CFU[y] | 2.6 | 45.3 | 43.5 |

[z] Unit definition: one unit will release 1.0 nmol of *p*-nitrophenol from the appropriate substrate per minute at 37℃.
[y] CFU: colony-forming unit.

## 討論

沫蟬常分布於其寄主植物靠近地表的主莖上，若蟲分泌泡沫液覆蓋全身，皆不見有發霉現象，且已知柳尖胸沫蟬 (*Aphrophora costalis*) 泡沫液可抑制真菌生長 (Maksyutova *et al*. 1999)。此抑制真菌生長的能力，可能來自於沫蟬本身、寄主植物或伴隨而來之微生物。本研究首度由廣泛分布於台灣的嗜菊短頭脊沫蟬泡沫液中，分離出 2 種細菌 *S. maltophilia* AY 及 *D. tsuruhatensis* DT，此 2 種細菌皆可直接抑制真菌生長。其中，*S. maltophilia* 為革蘭氏陰性桿菌，原歸在假單胞菌屬 (*Pseudomonas*)，後改歸在黃單胞菌屬 (*Xanthomonas*)，最後獨立為 *Stenotrophomonas* 屬 (Palleroni & Bradbury 1993)。此細菌分布廣泛，可於環境中自由生存，亦可為植物內寄生菌 (endophyte) (Ryan *et al*. 2009)。已知 *S. maltophilia* 可自植物內部組織如莖、根、根際分離，亦可由土壤中分離 (Juhnke & des Jardin 1989; Berg *et al*. 1996)。本研究首度提出由嗜菊短頭脊沫蟬泡沫液中分離得 *S. maltophilia*。此種沫蟬若蟲有 5 個齡期，若蟲末期 5 齡若蟲刺吸染成藍色的咸豐草汁液後 14.0 min，可見其排出藍色泡沫液 (Chang *et al*. 2011)。故可推論 *S. maltophilia* 很可能即是由此沫蟬之吸食行為，經由植物汁液進入沫蟬蟲體，再隨沫蟬排出之泡沫液流出體外。本研究採集嗜菊短頭脊沫蟬 4–5 齡若蟲，此時期沫蟬刺吸汁液量隨齡期上升，偏好分布在植物近根部之莖上，此亦增加 *S. maltophilia* 進入沫蟬蟲體機會。

大部分真菌的細胞壁組成中皆有幾丁質，幾丁質由 β-1,4-N-acetylglucosamine 聚合而成，可被幾丁質酶水解。幾丁質酶依其水解幾丁質的部位及產物，可概分為內幾丁質酶 (E.C. 3.2.1.14) 及外幾丁質酶。內幾丁質酶可由幾丁質鏈中間部位逢機水解幾丁質；外幾丁質

酶則由幾丁質鏈的非還原端水解幾丁質，釋出 di-acetylchitobiose 者稱為幾丁二醣酶 (E.C. 3.2.1.29)，釋出 β-1,4-N-acetylglucosamine 者稱為 N-乙醯葡萄糖胺酶 (E.C. 3.2.1.30) (Tronsmo & Harman 1993)。

*S. maltophilia* 34S1 品系於 30℃培養 72 h，以幾丁二醣酶的模式受質，可測得其活性將近 0.3 nmol *p*-nitrophenol $min^{-1}$ $10^{-9}$ CFU (Kobayashi *et al*. 2002)。本研究分離之 *S. maltophilia* AY 品系於 30℃培養 60 h，同樣受質測得之活性為 45.3 nmol *p*-nitrophenol min $10^{-9}$ CFU，為其 151 倍。二者不同的原因，除了菌種品系不同外，培養液亦不同，本研究使用之培養液係參考 Zhang *et al*. (2001)，彼等將 *S. maltophilia* C3 於 25℃培養 10 d，同樣受質測得之幾丁二醣酶活性為 1,622 nmol *p*-nitrophenol$^{-1}$ $min^{-1}$ $10^{-9}$ CFU。若皆以平均培養生長 1 h 評估其幾丁質酶產出效率，*S. maltophilia* C3 與 *S. maltophilia* AY 測得之活性各為 6.758 與 0.755 nmol *p*-nitrophenol min $10^{-9}$ CFU。*S. maltophilia* C3 之幾丁二醣酶，為本研究 *S. maltophilia* AY 的 9.0 倍。二者不同的原因，除了菌種品系不同外，亦可能為本研究分離之 *S. maltophilia* AY 尚未經最適培養條件篩選。培養基成分與 pH 值對細菌產生大量幾丁質酶量有很大影響 (Prakash *et al*. 2015)，未來 *S. maltophilia* AY 欲實際應用於生物防治前，需再進一步篩選最適培養、量產條件。早期研究發現多數植物分泌內幾丁質酶，細菌則分泌外幾丁質酶如幾丁二醣酶 (Roberts & Selitrennikoff 1988)。本研究除確認細菌 *S. maltophilia* AY 分泌屬於外幾丁質酶之幾丁二醣酶且比活性最高，亦確認其可分泌同屬於外幾丁質酶之 N-乙醯葡萄糖胺酶及內幾丁質酶。

多環芳香烴 (polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs) 可由石油精煉過程而來，結構多樣，其中很多對生物具有毒性，並已證實其中多種對人體具致癌性。造成環境、生態的汙染。*S. maltophilia* 除在生物防治中深具潛力外，*S. maltophilia* AJH1 在酸性 pH 2 的培養基中，亦具有分解多環芳香烴之能力 (Arulazhagan *et al*. 2017)。此亦提供本研究分離而得之 *S. maltophilia* AY 未來可能應用及進一步研究的方向。*D. tsuruhatensis* 則因有前人研究未檢測到幾丁質酶活性 (Prasannakumar *et al*. 2015)，故本研究不再進行其幾丁質酶評估。

拮抗菌 *S. maltophilia*、*D. tsuruhatensis* 在生物防治研究中，長期備受矚目。其中，*S. maltophilia* C3 可抑制 *Bipolaris sorokiniana* 引起的黑麥草葉斑病 (Zhang & Yuen 2000; Zhang *et al*. 2001)。*S. maltophilia* C5 可抑制 *B. sorokiniana* 引起的草坪草 (Kentucky bluegrass) 之夏季斑枯病 (summer patch disease) (Kobayashi *et al*. 2002)。*D. tsuruhatensis* 可促進植物生長、抑制多種真菌 (Han *et al*. 2005)。*D. tsuruhatensis* BT1 分泌多種化學物質及酵素促進番茄生長，並抑制其葉部及根圈病菌 (Prasannakumar *et al*. 2015)。*S. maltophilia* 與 *D. tsuruhatensis* 這 2 種細菌以往被視為對人類屬於低致病性細菌，但近來在免疫力不全的病人中亦曾發現 (Chang *et al*. 2011; Alavi *et al*. 2013; Tabak *et al*. 2013; Singh *et al*. 2017)，*S. maltophilia* 更進而出現在醫院院內感染及社區型感染報告中 (Chang *et al*. 2011)。這些細菌對人體健康的負面報告，皆對拮抗菌在農業生物防治中的應用性提出警訊。*S. maltophilia* 與 *D. tsuruhatensis* 這 2 種細菌未來若應用於生物防治，須經更謹慎的評估其對人體健康的危害，並斟酌使用方式。除此之外，之前對人體健康無相關危害報告的細菌，是真的無致病性、低致病性，還是只是尚未發現病例。隨著醫學越來越發達，人類壽命延長，醫院內免疫力低弱的病人越來越多，這些本來僅是無致病性、低致病性的伺機性病原 (opportunistic pathogens) 細菌，在未來也都可能傳出危害免疫力低弱病人的報告。吾人在選擇用於生物防治中的拮抗菌時，也須持更謹慎的態度，以期在農業收益、減少化學農藥使用量、保護人類健康等多重考量層面下，得到最大效益。

## 誌謝

本研究承行政院農業委員會 101 農科-10.2.1-農-C5 計畫經費補助。試驗期間承朱雅琳小姐、楊侑蓁小姐協助養蟲及相關試驗執行，謹此致謝。

# 引用文獻

Ajayi, O. and F. A. Oboite. 2000. Importance of spittle bugs, *Locris rubens* (Erichson) and *Poophilus costalis* (Walker) on sorghum in West and Central Africa, with emphasis on Nigeria. Ann. Appl. Biol. 136:9–14.

Alavi, P., H. Müller, M. Cardinale, C. Zachow, M. B. Sánchez, J. L. Martínez, and G. Berg. 2013. The DSF quorum sensing system controls the positive influence of *Stenotrophomonas maltophilia* on plants. PLOS ONE 8:e67103. doi:10.1371/journal.pone.0067103

Arulazhagan, P., K. Al-Shekri, Q. Huda, J. J. Godon, J. M. Basahi, and D. Jeyakumar. 2017. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by an acidophilic *Stenotrophomonas maltophilia* strain AJH1 isolated from a mineral mining site in Saudi Arabia. Extremophiles 21:163–174.

Berg, G., P. Marten, and G. Ballin. 1996. *Stenotrophomonas maltophilia* in the rhizosphere of oilseed rape-Occurrence, characterization and interaction with phytopathogenic fungi. Microbiol. Res. 151:19–27.

Carvalho, F. R. S., F. R. Nastasi, R. C. Gamba, A. S. Foronda, and V. H. Pellizari. 2008. Occurrence and diversity of *Legionellaceae* in polar lakes of the Antarctic Peninsula. Curr. Microbiol. 57:294–300.

Chang, Y. T., P. W. Yang, C. T. Hung, W. L. Lin, and Y. H. Chen. 2011. The role of *Stenotrophomonas maltophilia* in healthcare-associated and community-acquired infections. Infect. Control J. 21:341–348. (in Chinese with English abstract)

Chang, S. C., H. T. Shih, and K. H. Lu. 2019. Antifungal effect and chitinase activities of the froth of spittlebug *Poophilus costalis* (Walker) (Hemiptera: Cercopoidea: Aphrophoridae). J. Asia Pac. Entomol. 22:269–273.

Guilbeau, B. H. 1908. The origin and formation of the froth in spittle-insects. Amer. Nat. 42:783–798.

Han, J., L. Sun, X. Dong, Z. Cai, X. Sun, H. Yang, Y. Wange, and W. Song. 2005. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. Syst. Appl. Microbiol. 28:66–76.

Johnson, A. D. 2010. An extended IUPAC nomenclature code for polymorphic nucleic acids. Bioinformatics 26:1386–1389.

Juhnke, M. and E. des Jardin. 1989. Selective medium for isolation of *Xanthomonas maltophilia* from soil and rhizosphere environments. Appl. Environ. Microbiol. 55:747–750.

Kobayashi, D. Y., R. M. Reedy, J. Bick, and P. V. Oudemans. 2002. Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. Appl. Environ. Microbiol. 68:1047–1054.

Maksyutova, N. N., I. A. Tarchevsky, D. V. Yusupova, E. L. Gvozdeva, T. A. Valueva, and V. G. Yakovleva. 1999. Enzymatic activity of aphroproteins. Biochemistry 64:780–782.

Marshall, A. T. 1966. Spittle-production and tube-building by cercopid larvae (Homoptera)- IV. Mucopolysaccharide associated with spittle-production. J. Insect Physiol. 12:635–644.

Marshall, A. T. 1973. Protein synthesis and secretion by the Malpighian tubules of cercopoid larvae (Homoptera). J. Insect Physiol. 19:2317–2326.

Mello, M. L. S., E. R. Pimentel, A. T. Yamada, and A. Storopoli-Neto. 1987. Composition and structure of the froth of the spittlebug, *Deois* sp. Insect Biochem. 17:493–502.

Nawani, N. N., B. P. Kapadnis, A. D. Das, A. S. Rao, and S. K. Mahajan. 2002. Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora* sp. V2. J. Appl. Microbiol. 93:965–975.

Palleroni, N. J. and J. F. Bradbury. 1993. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings *et al*. 1983. Intl. J. Syst. Bacteriol. 43:606–609.

Prakash, B., P. Perumal, J. Gowrishankar, P. Sivasankari, L. Ashokkumar, and P. Tamilmani. 2015. Optimization of cultural conditions for production of chitinase by *Bacillus* sp. isolated from agriculture soil using substrate as marine crab shell waste. Intl. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 4:192–198.

Prasannakumar, S. P., D. H Gajendramurthy, P. Hariprasad, S. Prasad, and S. R. Niranjana. 2015. *Delftia tsuruhatensis* WGR-UOM-BT1, a novel rhizobacterium with PGPR properties from *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz also suppresses fungal phytopathogens by producing a new antibiotic- AMTM. Lett. Appl. Microbiol. 61:460–468.

Roberts, W. K. and C. P. Selitrennikoff. 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. J. Gen. Microbiol. 134:169–176.

Ryan, R. P., S. Monchy, M. Cardinale, S. Taghavi, L. Crossman, M. B. Avison, G. Berg, D. Van Der Lelie, and J. M. Dow. 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. Nat. Rev. Microbiol. 7:514–525.

Shih, H. T. and J. T. Yang. 2002. Three new records of Aphrophoridae (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cercopoidea) from the Kinmen Islands (Taiwan). Pol. Pis. Entomol. 71:91–100.

Singh, V. K., A. Mishra, and B. Jha. 2017. Anti-quorum sensing and anti-biofilm activity of *Delftia tsuruhatensis* extract by attenuating the quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. Front. Cell. Infect. Microbiol. 7:337. doi:10.3389/fcimb.2017.00337

Tabak, O., B. Mete, S. Aydin, N. M. Mandel, B. Otlu, R. Ozaras, and F. Tabak. 2013. Port-related *Delftia tsuruhatensis* bacteremia in a patient with breast cancer. New Microbiol. 36:199–201.

Tronsmo, A. and G. E. Harman. 1993. Detection and quantification of *N*-acetyl-β-D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. Anal. Biochem. 208:74–79.

Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173:697–703.

Zhang, Z. and G. Y. Yuen. 2000. Effects of culture fluids and preinduction of chitinase production on biocontrol of *Bipolaris* leaf spot by *Stenotrophomonas maltophilia* C3. Biol. Control 18:277–286.

Zhang, Z., G. Y. Yuen, G. Sarath, and A. R. Penheiter. 2001. Chitinases from the plant disease biocontrol agent, *Stenotrophomonas maltophilia* C3. Phytopathology 91:204–211.

# Antifungal Effect of Antagonistic Bacteria Isolated from the Froth of Spittlebug *Poophilus costalis* Against Phytopathogenic Fungi

Shu-Chen Chang[1], Hsien-Tzung Shih[2], Jyh-Nong Tsai[3], Tsung-Chun Lin[4], and Kuang-Hui Lu[5,*]

## Abstract

Chang, S. C., H. T. Shih, J. N. Tsai, T. C. Lin, and K. H. Lu. 2019. Antifungal effect of antagonistic bacteria isolated from the froth of spittlebug *Poophilus costalis* against phytopathogenic fungi. J. Taiwan Agric. Res. 68(3):226–236.

For no fungi growing on the froth of spittlebug in field, the antifungal effect and chitinase activity of the bacteria isolated from the froth of *Poophilus costalis* (Walker, 1851) were analyzed in this study. Two isolates of bacteria had high antagonistic activities against *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* and *Colletotrichum gloeosporioides* Penz were identified as *Stenotrophomonas maltophilia* AY and *Delftia tsuruhatensis* DT by 16S rDNA and chitinase gene sequences. *S. maltophilia* AY produced 1.1, 19.9, and 19.1 nmol *p*-nitrophenol $min^{-1}$ $mg^{-1}$ protein of exochitinase β-N-actylglucosaminidase, chitobiosidase and endochitinase, respectively. These two antagonistic bacteria may have the application potential on pathogenic control in the future.

**Key words:** *Stenotrophomonas maltophilia*, *Delftia tsuruhatensis*, Chitinase, Antifungal effect.

Received: June 21, 2018; Accepted: March 25, 2019.
[*] Corresponding author, e-mail: khlu@dragon.nchu.edu.tw
[1] Assistant Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Associate Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[4] Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[5] Professor, Department of Entomology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 68(3):237–245 (2019)
DOI:10.6156/JTAR.201909_68(3).0005 研究報告

# 覆膜處理對台灣北部地區冬季甘藷健康種苗生產及蟲害發生之影響

羅淑芳[1] 黃守宏[2,*]

## 摘要

羅淑芳、黃守宏。2019。覆膜處理對台灣北部地區冬季甘藷健康種苗生產及蟲害發生之影響。台灣農業研究 68(3):237–245。

作物畦面上進行覆蓋措施，為相對簡易及低投資成本的設施，具有提高土壤溫度、提升作物生長速度及產量等潛在特點。本試驗於新北市金山地區之冬季時期，利用覆膜方式進行冬季甘藷健康種苗生產研究，顯示在冬季時期 (12 月至翌年 2 月期間) 大氣平均溫度在 11.1–20.1℃間，覆蓋黑色 polyethylene (PE) 塑膠布可明顯提高土壤溫度，於土壤下 8 cm 的溫度與大氣溫度之間，最高可相差 6℃。「台農 57 號」及「台農 66 號」種苗於 PE 覆膜處理之蔓重 (分別為 452.2 g 及 272.3 g)、大於 30 cm 的蔓數 (分別為 7.9 蔓及 5.4 蔓) 及塊根重 (分別為 225.4 g 及 209.8 g)，明顯較可分解塑膠膜及無覆膜等處理為佳，種苗存活率也可達 90% 以上。冬季甘藷生長初期前 4 mo (12 月至翌年 3 月) 間，害蟲種類及數量之發生甚少；4 月起之調查結果顯示各處理區中，多種害蟲發生數量逐漸增多，特別是鳥羽蛾，每條藷蔓平均密度最高可達 0.7 隻；其次為金花蟲，每條藷蔓平均密度可達 0.4 隻。甘藷蟻象在 3 種處理下為害塊根數 (1 個以下) 甚低，推測為低溫造成蟻象族群密度甚低所致。

**關鍵詞**：覆膜處理、甘藷種苗、害蟲。

## 前言

台灣地處熱帶及亞熱帶地區，適合多種作物周年生產，但也因生產過程中，常遭受極端天氣、土壤及疫病蟲害等因素之影響，而使作物之生長栽培有所限制。為了改善此等限制因子，增加作物對逆境的抵抗能力，往往會藉由一些資材或設施的協助來達到此一目的。依作物生長特性及產品單價等因子，目前已開發利用畦面覆膜、隧道式塑膠布、網室及溫室等方式進行，提供作物適當生長環境，以獲得快速生長、提高產量及穩定品質等目的。其中，於作物種植的畦面上進行覆蓋措施，為相對簡易及低投資成本的方法。此方式不僅可以提高土壤溫度、提升桃、杏仁、甘藷、洋香瓜、甜瓜及花生等作物生長速度及產量等特點 (Ducan *et al*. 1992; Ossom *et al*. 2001; Yang 2001; Ramakrishna *et al*. 2006; Lu *et al*. 2013; Lo *et al*. 2014)，亦可形成物理阻隔作用，降低病、蟲、草害的入侵與危害等用途 (Johnson *et al*. 1981; Natwick & Durazo 1985; Thomas *et al*. 2009; Chang 2010)，降低作物生產成本與損失，為目前農業普遍採行改善耕作的方法之一。

位於台灣北部沿海的新北市金山地區，為陽明山 (大屯火山群) 下的沖積平原，具有豐富礦物質及排水性良好的土壤，相當適合甘藷的生長，加上陽明山的清澈水源，所生產的甘

投稿日期：2019 年 1 月 14 日；接受日期：2019 年 4 月 9 日。
* 通訊作者：shhuang@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系前副研究員。台灣 嘉義市。
[2] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系副研究員。台灣 嘉義市。

藷品質相當優良，為當地相當重要產業作物之一。每年所舉辦的「金山甘藷節」，已成為重要地方產業活動。惟當地春夏作種植之甘藷種苗，因該地區冬季低溫的氣候，難以自行進行健康種苗繁殖作業。是故，甘藷健康種苗必需仰賴中南部地區的生產與供應，由於供應種苗批次有限，通常僅有 2 次，對於當地甘藷種苗種植時間、氣候條件及人力等情況的搭配與調整，往往造成相當大的困擾。發展當地甘藷種苗生產作業，可舒緩部分種苗的供應，逐步解決種苗供需及產期調節種植等相關問題，以健全該地區甘藷產業的永續發展。

據此，本試驗擬於該地區之冬季時期，利用甘藷健康種苗及配合覆膜方式進行冬季種苗生產研究，希望藉由覆膜方式以提高土壤溫度，期望能提高甘藷健康種苗在冬季低溫時期的存活率及生長，並達到經濟生產。同時，亦期能降低病蟲害的發生與危害，逐漸提升自行生產健康的甘藷種苗，提供春夏作種植所需，達到現地培育健康種苗、品質管控及降低生產成本之目的。

# 材料與方法

## 供試品種

本試驗之甘藷品種計有「台農 57 號」(‘Tainung No.57’) 及「台農 66 號」(‘Tainung No.66’)，種苗為行政院農委會農業試驗所嘉義農試分所生產之組織培養苗，經病毒檢驗確定為健康種苗。經種植於採種圃約 70 d 生長期後，再取先端苗 (約 30 cm) 進行健康種苗越冬試驗，試驗地點於新北市金山區 (25°13’17.5” N, 121°36’25.9” E) 進行。

## 覆蓋處理

甘藷健康種苗於 2014 年 11 月 27 日種植於新北市金山區 0.2 ha 試驗田，種植行株距為 1.00 m × 0.25 m，採完全逢機設計 (complete randomized design; CRD)，處理因子為「台農 57 號」及「台農 66 號」等 2 品種，進行黑色塑膠布 (polyethylene; PE) (厚度 0.03 mm，CJ-200，安稼企業股份有限公司，台灣高雄市) 覆膜 (plastic cover) 處理。但因考量 polyethylene (PE) 塑膠布對環境造成之汙染等影響，以可分解塑膠膜 [poly lactic acid (PLA) 澱粉聚合物] (厚度 0.03–0.05 mm，清煬科技股份有限公司，台灣彰化縣) 覆蓋 (biodegradable plastic cover) 作另一處理，並以無覆蓋處理為對照組，總計共有 6 組合。每組合重複 4 次，每組合小區面積約 75 $m^2$ [1.5 m (W) × 50 m (L)]，各種植約 215 株健康種苗。種植前施用硫銨 40 kg 0.1 $ha^{-1}$ (台灣肥料公司，台灣台北市) 為基肥。無覆膜處理雜草控制方式為種植當日及種植後 1.5 mo，施用 45.1% 拉草乳劑 (華隆化學股份有限公司，台灣台北市) 及 17.5% 伏寄普乳劑 (中華民國農會，台灣台中市)，施用劑量為 10 L $ha^{-1}$，稀釋倍數為 1,000×。

## 植株性狀及健康種苗存活率調查

試驗區於 2015 年 4 月 28 日收穫，並進行植株性狀及健康種苗存活率調查。植株性狀調查方式，為每小區以 12 m 取 1 樣品 (每小區取 3 個樣品)，0.2 ha 共取 72 個樣品。共計調查蔓重 (g)、每株最長蔓長 (cm)、大於 60 cm (可覆蓋畦面長度) 蔓數、大於 30 cm (先端苗長度) 蔓數、大於 5 cm 總芽數、塊根數及塊根重 (g) 等。種苗存活率調查方式為各處理中，調查各品種甘藷種苗之存活率，每組合調查 3 點，每點調查 15 株種苗，以計算各處理之各品種種苗存活率。

## 溫度資訊取得與調查方式

新北市金山地區 2014 年 12 月 1 日至 2015 年 4 月 30 日之試驗期間每日平均溫度資料，取自中央氣象局金山觀測站之紀錄 (http://e-service.cwb.gov.tw/HistoryDataQuery/index.jsp)。田間溫度調查方式，為在甘藷健康種苗種植後，每個月利用溫度測定儀 (Center 309, Center Technology Co., New Taipei, Taiwan) 測量不同組合區之大氣、土表及土表下 8 cm 等 3 個位置之溫度。調查方式為每組合取樣 6 點，每點測量上述 3 個位置之溫度，溫度測量時間為調查當日 15:00–17:00 間，檢測其溫度變化

與甘藷種植畦面是否有覆蓋物、覆蓋物質種類，及於大氣與土表不同深度而有所差異。

### 害蟲調查方式

甘藷種苗種植後，每個月進行調查 1 次，於各組合區進行取樣調查共計 6 點，每點調查 5 條甘藷藤蔓，記錄於藤蔓上發生之害蟲種類 [包含粉蝨 (whitefly)、蚜蟲 (aphid)、鳥羽蛾 (plume moth)、椿象 (sting bug)、葉蟬 (leafhopper)、夜蛾 (noctuid moth) 及金花蟲 (leaf beetle)] 及數量。並於甘藷收獲時，每小區以 12 m 取 1 樣品 (每小區取 3 個樣品)，0.2 ha 共取 72 個樣品。依取樣甘藷植株之塊根，計算其總塊根數目及被甘藷蟻象 (sweet potato weevil) 為害塊根之數目。

### 統計分析

甘藷植株性狀調查所得資料，經雙因子變方分析 (two-way analysis of variance; two-way ANOVA)，處理間若有差異，再以最小顯著差異檢測法 (Fisher's least significant difference test; LSD test) 進行比較。對於甘藷蟻象對甘藷塊根之危害比較，以卡方檢定 (Chi-square test) 進行分析檢測。

## 結果

### 新北市金山地區大氣溫度變化與不同處理之溫度調查

由中央氣象局新北市金山觀測站 2014 年 12 月至 2015 年 4 月間日平均溫度變化結果 (圖 1)，顯示在甘藷種植後 3 mo 內，溫度變化在 11.1–20.1℃間 (月平均溫度為 15.3–15.7℃)。第 4 個月開始溫度開始逐漸上升 (月平均溫度為 17.0℃)，第 5 個月 (4 月份) 月平均溫度上升至 20.9℃。

經由每個月測量覆蓋黑色 PE 塑膠布、可分解塑膠膜及無覆蓋之大氣、土表及土表下 8 cm 之溫度變化 (圖 2)，初步結果顯示於 2015 年 3 月以前，檢測之大氣溫度在 18℃以下時，不論於種植甘藷的畦面上是否有覆膜的存在，土表下 8 cm 溫度均比大氣溫度略高。其中，又以覆蓋 PE 塑膠布最為明顯，特別是大氣溫度愈低時溫差愈明顯，最高可相差 6℃左右。但於 4 月份大氣溫度回暖之際的調查結果，在大氣溫度 30℃左右時，土表下 8 cm 左右的溫度並未隨之升高，三個處理的溫度則保持在 26–28℃之間，與大氣溫度相差 1.6–1.8℃。

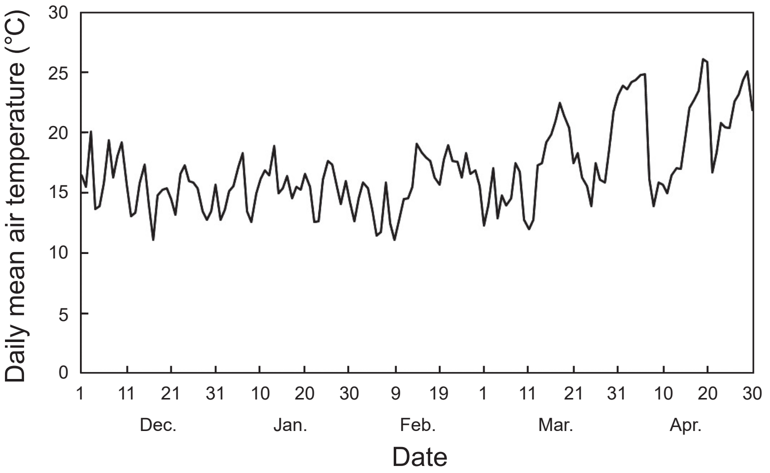


**圖 1.** 2014 年 12 月至 2015 年 4 月期間新北市金山地區日均溫變化。

**Fig. 1.** Daily mean air temperature from December 2014 to April 2015 at Jinshan District of New Taipei City, Taiwan.

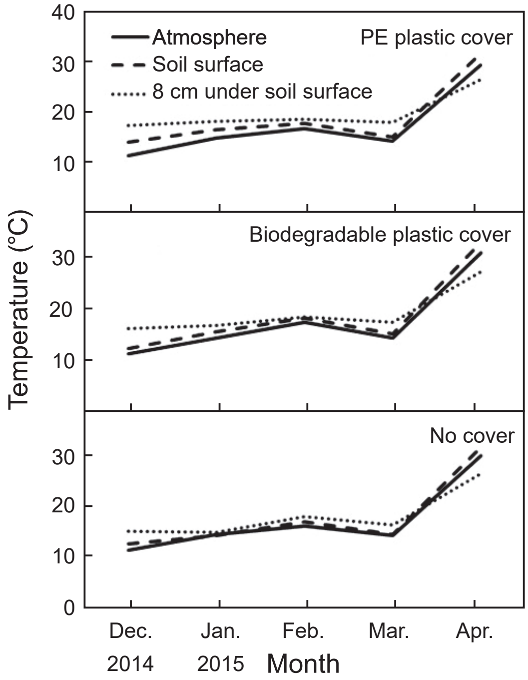


**圖 2.** 不同覆膜處理下之大氣、土表及土表下 8 cm 之溫度變化情形。

**Fig. 2.** Fluctuation of temperatures in atmosphere, soil surface and 8 cm deep under soil surface in different cover treatments.

## 植株性狀及種苗存活率調查

不同覆膜方式對冬季甘藷健康種苗植株性狀及存活率之調查，如表 1。甘藷「台農 57 號」及「台農 66 號」健康種苗於 PE 覆膜處理之蔓重 (分別為 452.2 g 及 272.3 g)、大於 30 cm 的蔓數 (分別為 7.9 蔓及 5.4 蔓) 及塊根重 (分別為 225.4 g 及 209.8 g)，明顯較可分解塑膠膜及無覆膜等處理為佳，其餘性狀則無顯著差異。兩個甘藷品種在 PE 覆膜處理下之種苗存活率最高，可達 90% 以上，可分解塑膠膜及無覆蓋之種苗存活率，則分別降低至 76–78% 及 71% 左右 (表 1)。

## 種苗蟲害發生情形之調查

由 2014 年 12 月種植之甘藷種苗，進行畦面覆蓋黑色 PE 塑膠布、可分解塑膠膜及無覆蓋等 3 個處理，調查各處理所種植「台農 57 號」及「台農 66 號」甘藷品種生育期間之蟲害發生

**表 1.** 甘藷「台農 57 號」及「台農 66 號」在 3 種不同覆膜處理下生長 152 d 之農藝特徵表現及存活率情形。

**Table 1.** The agronomic traits and survival rate of seedlings of sweet potato ‘Tainung No.57’ and ‘Tainung No.66’ grown under treatments of black polyethylene (PE) plastic cover, biodegradable plastic cover and no cover after 152 d of growth.

| | | Agronomic trait | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cultivar | Treatment[z] | Vine weight (g) | Maximum vine length (cm) | Number of vine length (> 60 cm) | Number of vine length (> 30 cm) | Number of shoots (> 5 cm) | Number of storage root | Storage root weight (g) | Survival rate (%) |
| ‘Tainung No.57’ | PE plastic cover | 452.2 a[y] | 61.3 a | 1.1 a | 7.9 a | 5.9 a | 4.1 a | 225.4 a | 93.3 |
| | Biodegradable plastic cover | 217.2 b | 43.9 ab | 0.3 a | 3.4 b | 5.1 a | 3.8 a | 115.8 b | 77.8 |
| | No cover | 109.7 b | 27.3 b | 0.0 a | 1.4 b | 4.9 a | 3.2 a | 58.1 b | 71.1 |
| ‘Tainung No.66’ | PE plastic cover | 272.3 a | 44.9 a | 0.1 a | 5.4 a | 5.7 a | 4.5 a | 209.8 a | 91.1 |
| | Biodegradable plastic cover | 164.4 ab | 37.7 a | 0.1 a | 2.9 ab | 5.3 a | 4.6 a | 172.2 ab | 75.6 |
| | No cover | 100.8 b | 27.6 a | 0.0 a | 0.7 b | 4.8 a | 3.6 a | 78.8 b | 71.1 |

[z] $n = 12$.
[y] Means within column for each cultivar followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher’s least significant difference (LSD) test.

情況 (圖 3)。初步可得知，冬季甘藷生長初期前 3 mo (12 月至翌年 2 月) 間，三個不同處理區於「台農 57 號」及「台農 66 號」甘藷上發生之害蟲種類及數目相差不多。其中，2 月份之調查結果以蚜蟲發生較多，葉蟬次之，而蚜蟲每條藷蔓平均密度在 0.7 隻以下；3 月份因低溫寒流之關係，害蟲種類及數量之發生隨之明顯減少，所調查到之害蟲密度為每藤蔓 0.1 隻以下。4 月起之調查結果顯示各處理區中，多種害蟲發生數量逐漸增多，特別是鳥羽蛾，每條藷蔓平均密度最高可達 0.7 隻；其次為金花蟲，每條藷蔓平均密度可達 0.4 隻。

### 甘藷蟻象之危害調查

2015 年調查冬季不同覆膜處理對塊根被甘藷蟻象為害影響，調查結果如表 2。結果顯示，在 PE 覆膜處理中，兩個品種之塊根被害數均為 0；可分解塑膠膜及無覆蓋區之被害數，兩個品種均為 1。此兩個甘藷品種下，3 種不同覆膜處理彼此間並無明顯差異存在 (‘Tainung No.57’: $\chi^2 = 0.74611$, $df = 2$, $P = 0.6886$; ‘Tainung No.66’: $\chi^2 = 0.79455$, $df = 2$, $P = 0.6721$)

## 討論

甘藷生長最適溫度為 18–30℃，在 10–15℃ 之低溫狀態下，則呈現休眠狀態 (Li 1994; Luo *et al*. 2014; Gajanayak *et al*. 2015)。新北市金山地區試驗期間，前三個月之大氣日均溫變化 (11.1–20.1℃) 顯示 (圖 1)，雖不適於甘藷正常生長，但進一步由大氣、土表及土表下 8 cm 之測量結果顯示 (圖 2)，覆膜處理可有效提高土壤溫度，利於種苗存活與生長，許多研究也呈現相同之結果 (Yang 2001; Ramakrishna *et al*. 2006; Novak *et al*. 2007; Lo *et al*. 2014)。試驗期間雖然有寒流來襲 (最低溫度為 11.5℃)，造成短暫的低溫環境，但調查 PE 覆膜處理之種苗存活率可達 90% 以上，證實利用此處理可確保種苗之存活率。雖然無覆膜處

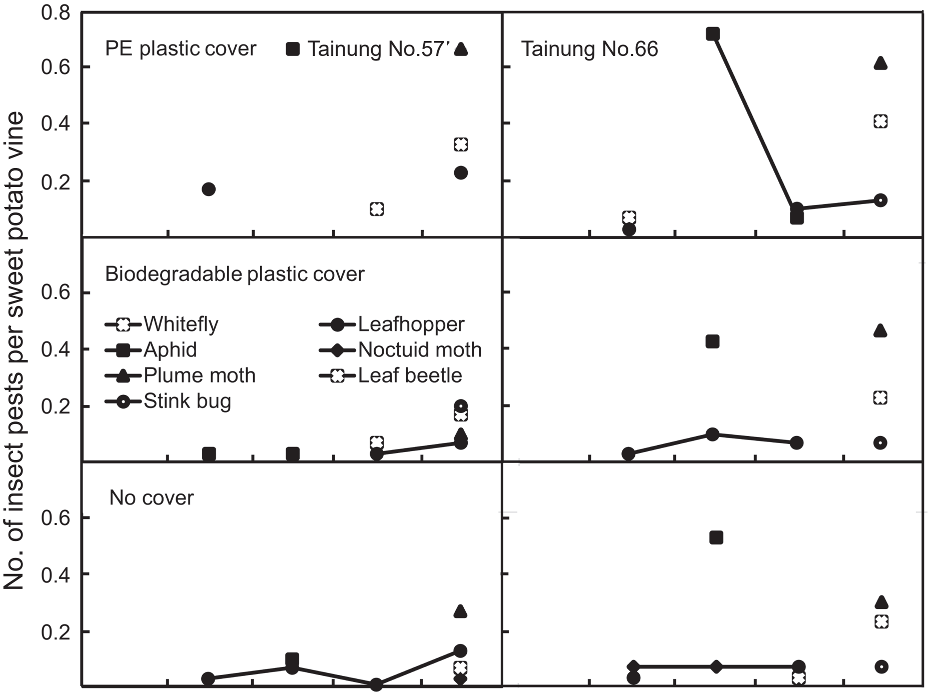


**圖 3.** 不同覆膜處理下之甘藷「台農 57 號」及「台農 66 號」上蟲害發生種類及族群變動情形。

**Fig. 3.** Fluctuation of insect pests of ‘Tainung No.57’ and ‘Tainung No.66’ in different cover treatments.

表 2. 甘藷「台農 57 號」及「台農 66 號」在 3 種不同覆膜處理下被甘藷蟻象為害之情形。

**Table 2.** Effects of treatments of black polyethylene (PE) plastic cover, biodegradable plastic cover and no cover on the infestations of sweet potato weevil on cultivars 'Tainung No.57' and 'Tainung No.66'.

| | 'Tainung No.57' | | 'Tainung No.66' | |
|---|---|---|---|---|
| Treatment | Number of storage root | Number of weevil damage | Number of storage root | Number of weevil damage |
| PE plastic cover | 30 | 0 a[z] | 36 | 0 a |
| Biodegradable plastic cover | 48 | 1 a | 43 | 1 a |
| No cover | 37 | 1 a | 48 | 1 a |
| *P*-value | | 0.6886 | | 0.6721 |

[z] Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Chi-square test.

理之種苗存活率也達 70% 左右，但經比較其他農藝性狀，此種處理方式在新北市金山地區對種苗經濟生產效益不高 (表 1)。可分解塑膠膜研發之目的，為改良 PE 塑膠膜不易分解之環保考量，但也因材質中添加澱粉，可在自然環境中逐漸分解，但相對質地脆弱、容易破碎 (Yang 2001)。試驗進行至第三個月開始，即已逐漸發現有破損現象 (圖 4)，覆蓋效果之持續性較差，各項調查結果也較不如預期有 PE 覆膜處理的成效。

幾項植株性狀調查結果顯示 (表 1)，「台農 57 號」及「台農 66 號」甘藷在 PE 覆膜處理與其他兩個處理間呈顯著差異，諸如蔓重，兩個甘藷品種分別較無覆膜處理增加 3.1 倍及 1.7 倍，蔓長分別增加 1.2 倍及 0.6 倍，顯示 PE 覆膜處理可有效提高甘藷生長勢。先端苗數量

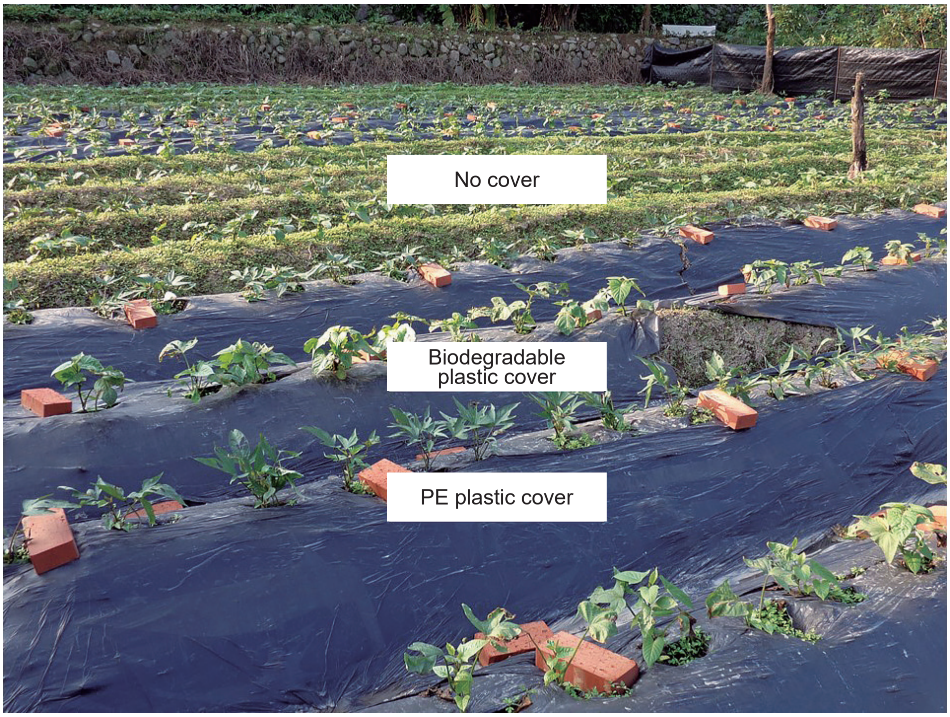


圖 4. 甘藷健康種苗於不同覆膜處理種植 40 d 的結果。

**Fig. 4.** The growth of healthy seedlings of sweet potato at 40 d after planting in different cover treatments.

(蔓長大於 30 cm) 分別增加 4.6 倍及 7.0 倍，此處理可有效提高種苗生產效率。單株塊根重，則分別增加 2.9 倍及 1.7 倍。此結果顯示，覆膜處理能促使塊根生長速度，也可減少藷蔓不定根之生長，減少翻蔓管理及維持塊根生產等優點 (Ossom *et al*. 2001; Lo *et al*. 2014)。

綜觀本研究與 Lo *et al*. (2014) 於嘉義地區 (亞熱帶地區) 冬季進行甘藷種苗生產研究之結果相似，但此試驗成果更可證實於台灣北部 (接近溫帶地區) 亦可進行。此外，更藉由增加測量大氣、土表及土表下 8 cm 之溫度變化，佐證覆膜處理可有效提高土壤溫度，利於冬季甘藷種苗存活與生長。可分解塑膠膜雖然具有在自然環境中逐漸分解的環保優點，但覆蓋效果之持續性較差，也較不如預期有 PE 覆膜處理的成效。

在台灣，利用阻隔的方式，以防止害蟲的入侵與危害，為害蟲防治上的重要措施之一，也有許多成功的應用 (Chang 1998; Chang 2010)。甘藷栽培上，亦有利用稻草鋪設於畦面上 (Talekar 1987)，或是中耕培土方式 (Huang & Cheng 2008)，來減少甘藷蟻象之危害。Lo *et al*. (2014) 於嘉義之試驗結果，亦可證實利用塑膠布阻隔之方式，具有降低甘藷蟻象鑽入土中為害甘藷塊根之成效。然而，本研究於台灣北部地區之試驗結果，甘藷蟻象為害數 (1 個以下) 甚低 (被害率在 2.7% 以下)，且處理間無明顯差異 (表 2)。每個月之田間蟲害調查 (圖 3)，也未曾發現此蟲出現，加上可能是試驗期間溫度較低 (圖 1)，甘藷蟻象族群數量也相對較低所致 (Chang *et al*. 1968)。

此外，同樣位於台灣北部沿海地區之新北市三芝區，近年來發現同樣是危害甘藷塊根之甘藷粗糙象鼻蟲 (*Blosyrus herthus* Herbst)，造成塊根表面略凹陷之溝槽食痕 (Chuang & Shih 2014)。而在本試驗調查之結果，特別是再進行無任何覆蓋措施的對照組，並未發現甘藷粗糙象鼻蟲的危害，而此蟲後續對金山地區甘藷春作甘藷生產之危害情況，有待進一步追蹤調查。

此試驗之覆膜處理為利用 PE 塑膠布覆蓋於作物種植的畦面上，對害蟲而言，僅可保護作物的地下部，作物地上部完全暴露於害蟲之危害影響範圍，上述 3 種處理之蟲害發生種類及數量彼此間並無明顯之差別 (圖 3)。於新北市金山區於 1–3 月低溫時期 (月平均溫度為 15.3–15.7℃) (圖 1)，蟲害發生種類及數量甚低 (圖 3)，於 4 月份大氣溫度逐漸上升 (月平均溫度為 20.9℃)，害蟲發生種類及數量有逐漸增加之現象，特別是鳥羽蛾、金花蟲及夜蛾類等害蟲，Lo *et al*. (2016) 之調查結果亦相近。此時期需特別監測害蟲密度，必要時需加強防治，以及時抑制害蟲族群急遽增長，以避免影響後期種苗之正常生產。

因此，試驗採用健康種苗，所以於生長期間並未發現任何種苗傳播之病害，特別是病毒病害的發生，僅於生育末期有少數基腐病之發生 (發生率在 8.9% 以下)。推測此病害之發生，為前期作甘藷罹病殘株上殘留之病原感染所致 (Clark *et al*. 2013; Huang *et al*. 2016)。

台灣北部濱海地區，冬季受到東北季風的影響，低溫及多雨的氣候條件不適於多種作物之生長與繁殖。本研究於新北市金山地區利用畦面覆蓋黑色 PE 塑膠布之方式，以提高土壤溫度，促使甘藷種苗於冬季時期能存活與生長，並於翌年 3–4 月大氣溫度回暖之際，能更快速成長，以繁殖該地區春夏作甘藷所需之種苗，舒緩部分種苗供應問題，逐步建立當地甘藷產業之永續發展。惟甘藷為無性繁殖之作物，種苗健康與否攸關後期甘藷的生長與產量甚大，建議該地區往後要進行冬季種苗生產計畫，應購買自檢驗合格之種苗供應商，或自行技轉此健康種苗生產技術，以確保種苗之健康與品質。

## 誌謝

本試驗研究承蒙新北市金山區農會及金山區甘藷產銷班第一班協助試驗區之設置與管理，本分所農藝系廖大經先生協助試驗資料統計分析，曾添水先生協助試驗取樣與調查等工作，試驗研究才得以更順利完成，在此一併致謝。

# 引用文獻


Chang, C. P. 1988. The occurrence and control of *Bradybanea similaris* (Ferussac). Res. Bull. Tainan DARES 21:1–2. (in Chinese with English abstract)

Chang, S. J. 2010. Barrier effect. p.96–108. *in*: Nonsynthetic Resources for Pest Management. (Wang, C. L., J. Z. Yu, C. T. Lu, F. C. Lin, and H. T. Shih, eds.) Special Publication No. 142. Taiwan Agric. Res. Inst. Press, Taichung, Taiwan. 183 pp. (in Chinese)

Chang, S. S., F. C. Yen, and C. F. Chen. 1968. Research on the ecology of sweet potato weevil, *Cylas formicarius* Fabricius. Res. Bull. Taichung DARES 1:17–26. (in Chinese)

Chuang, K. H. and H. P. Shih. 2014. Damage and control of *Blosyrus herthus* Herbst. Agric. News Taoyuan Dist. 88:8–9. (in Chinese)

Clark, C. A., D. M. Ferrin, T. P. Smith, and G. J. Holmes. 2013. Compendium of Sweet Potato Disease, Pests, and Disorders. 2nd ed. APS Press. St. Paul, MN. 160 pp.

Ducan, R. A., J. J. Stapleton, and M. V. McKenry. 1992. Establishment of orchards with black polyethylene film mulching: Effect of nematode and fungal pathogens, water conservation, and tree growth. J. Nematol. 24:681–687.

Gajanayake, B., K. R. Reddy, and M. W. Shankle. 2015. Quantifying growth and developmental responses of sweet potato to mid- and late-season temperature. Agron. J. 107:1854–1862.

Huang, S. H. and C. H. Cheng. 2008. The insect pests of sweet potato and management in Taiwan. p.153–163. *in*: Proceeding of Symposium on Research and Development of Sweet Potato. October 8, 2008. Taipei, Taiwan. Chinese Culture Univ. Press. Taipei, Taiwan. (in Chinese with English abstract)

Huang C. W., H. R. Yang, C. Y. Lin, S. L. Hsu, S. Y. Lai, and H. F. Ni. 2016. The study of physiological characteristics and control of *Phomopsis destruens* causing foot rot of sweet potato. J. Taiwan Agric. Res. 65:45–53. (in Chinese with English abstract)

Johnson, A. W., C. A. Jaworski, N. C. Glaze, D. R. Sumner, and R. B. Chalfant. 1981. Effects of film mulch and soil pesticides on nematodes, weeds, and yields of vegetable crops. J. Nematol. 13:141–148.

Li, L. 1994. Introduction of Upland Crops (III) Sweet Potato. Taiwan Upland Crop Development Foundation. Taipei. Taiwan. 1350 pp. (in Chinese)

Lo, S. F., C. L. Huang, and S. H. Huang. 2014. Effects of covering PE plastic on the production of sweet potato seedlings and infestation of sweet potato weevil. Crop, Environ. Bioinform. 11:169–176. (in Chinese with English abstract)

Lo, S. F., C. Y. Lin, and S. H. Huang. 2016. Healthy seedlings propagation technology development, insect pests density survey and cost analysis for sweet potato grown in winter season in northern Taiwan. Crop Environ. Bioinform. 13:116–125. (in Chinese with English abstract)

Lu, S. H., Y. J. Dong, J. Yuan, H. Lee, and H. Padilla. 2013. A high-yielding, water-saving innovation combining SRI with plastic cover on no-till raised beds in Sichuan China. Taiwan Water Conserv. 61:94–109. (in Chinese with English abstract)

Luo, X. F., Q. C. Tu, F. Qiao, and R. D. Ye. 2014. Overwintering cultivation technique for new variety of vegetable-purposed sweet potato 'Fucaishu 18' in open field condition. Fujian Agric. Sci. Technol. 7:44–45. (in Chinese with English abstract)

Natwick, E. T. and A. Durazo. 1985. Polyester covers protect vegetables from whiteflies and virus disease. Calif. Agric. 39(7):21–22.

Novak, B., I. Žutić, N. Toth, and N. Dobričević. 2007. Sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] yield influenced by seedlings and mulching. Agric. Conspec. Sci. 72:357–359.

Ossom, E. M., P. F. Pace, R. L. Rhykerd, and C. L. Rhykerd. 2001. Effect of mulch on weed infestation, soil temperature, nutrient concentration, and tuber yield in *Ipomoea batatus* (L.) Lam. Papua New Guinea. Trop. Agric. 78:144–151.

Ramakrishna, A., H. M. Tam, S. P. Wani, and T. D. Long. 2006. Effect of mulch on soil temperature, moisture, weed infestation and yield of groundnut in northern Vietnam. Field Crops Res. 95:115–125.

Talekar, N. S. 1987. Influence of cultural pest management techniques on the infestation of sweet potato weevil. Intl. J. Trop. Insect Sci. 8:809–814.

Thomas, J. E., L. T. Ou, L. H. Allen, Jr., J. C. Vu, and D. W. Dickson. 2009. Nematode, fungi, and weed control using Telone C35 and colored plastic mulches. Crop Prot. 28:338–342.

Yang, S. R. 2001. Study on the use of biodegradable plastics in the cultivation of horticultural crops. Res. Bull. Tainan DARES 38:30–44. (in Chinese with English abstract)

# Effects of Mulching on the Seedling Production and Infestation of Sweet Potato Insect Pests in Winter Season of Northern Taiwan

Shu-Fang Lo[1] and Shou-Horng Huang[2,*]

## Abstract

Lo, S. F. and S. H. Huang. 2019. Effects of mulching on the seedling production and infestation of sweet potato insect pests in winter season of northern Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 68(3):237–245.

Covering plastic on furrow surface has the advantages of easy operation, lower investment, and increasing the soil temperature, crop growth rate and yield. This trial was conducted in winter season in northern Taiwan to evaluate the production of seedlings of two sweet potato cultivars, 'Tainung No.57' and 'Tainung No.66', under different cover treatments. From December 2014 to February 2015, the daily mean air temperature was in the range of 11.1℃ to 21.1℃. Soil temperature at 8 cm depth was the highest under the covering of black polyethylene (PE) plastic treatment, and maximum temperature difference had reached 6℃ compared to air temperature. The agronomic traits of weight of maximum vine length (452.2 g and 272.3 g), number of the vine length longer than 30 cm (7.9 and 5.4) and tuber weight (225.4 g and 209.8 g) under the covering of black PE plastic treatment were higher than other treatments on sweet potato cultivars, 'Tainung No.57' and 'Tainung No.66', respectively. The survival rate of seedling was also higher than 90%. The density of insect pests was relatively low during December 2014 to March 2015, but increased gradually in April, particularly plum moth had reached 0.7 per sweet potato vine, followed by leaf beetle reaching 0.4 per sweet potato vine. The damage number of sweet potato tuber by sweet potato weevil was low (less than 1 tuber) under three treatments, suggesting that low density of sweet potato weevil suppressed significantly by the low temperature.

**Key words:** Mulching treatment, Sweet potato seedling, Insect pest.

Received: January 14, 2019; Accepted: April 9, 2019.

* Corresponding author, e-mail: shhuang@dns.caes.gov.tw

1 Former Associate Research Fellow, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

2 Associate Research Fellow, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 68(3):246–253 (2019)
DOI:10.6156/JTAR.201909_68(3).0006
研究報告

# 檬果壯鋏普癭蚋之潛在性天敵寄生蜂 *Aprostocetus* sp. (膜翅目：釉小蜂科) 寄生行為

林聖豐[1] 王釋玄[2] 李昂勳[2] 楊曼妙[3] 郝秀花[4,*]

## 摘要

林聖豐、王釋玄、李昂勳、楊曼妙、郝秀花。2019。檬果壯鋏普癭蚋之潛在性天敵寄生蜂 *Aprostocetus* sp. (膜翅目：釉小蜂科) 寄生行為。台灣農業研究 68(3):246–253。

本研究針對 *Aprostocetus* sp. 於檬果壯鋏普癭蚋的寄生率及寄生行為進行調查，分別在 2015 年 4 月及 10 月於高雄市而樣區調查。結果顯示，其寄生率介於 11–19%。抽樣葉片的癭蚋蟲癭數量與被寄生數呈正相關 ($r = 0.785$, $P < 0.001$)，與寄生率之相關性低 ($r = -0.291$, $P = 0.213$)，顯示寄生蜂寄生率不隨癭蚋族群大小而增減。向光處蟲癭的被寄生率 (19.3% ± 3.2%, $n = 9$) 顯著高於背光處 (4.9% ± 2.6%, $n = 9$) ($P < 0.050$)，顯示寄生蜂寄生偏好會受環境因子影響。癭蚋被寄生之時期主要在蟲癭的成長分化期及定型成熟期。寄生蜂成蟲插入產卵管的寄生方位為蟲癭的底部 (葉背方向)，但其離癭位置則多與癭蚋相同，即由蟲癭的端部羽化孔 (葉面方向) 離癭，僅少數寄生蜂由葉背方向離癭。室內飼養寄生蜂成蟲存活天數比較結果顯示，對照無提供營養組 [4 d ± 1 d ($n = 12$)]，提供 20% 蜂蜜水組 [9 d ± 1 d ($n = 12$)] 之成蟲個體存活天數較長，推論於田間栽植蜜源植物可延長此蜂存活天數及提升其寄生效率。未來將進一步測試其 *Aprostocetus* sp. 成蟲日律活動及增放效果，以評估作為防治檬果壯鋏普癭蚋的天敵資材可行性。

**關鍵詞**：檬果壯鋏普癭蚋、釉小蜂、寄生時期、產卵行為、防治策略。

## 前言

檬果壯鋏普癭蚋 (*Procontarinia robusta* Li, Bu & Zhang) 為雙翅目癭蚋科昆蟲，於檬果 (*Mangifera indica* L., Anacardiaceae) 葉片形成黑色小型蟲癭，可布滿葉面降低葉片光合作用，成蟲羽化離癭時會造成葉片傷口，引發病原菌感染影響植株生長，導致果實減產及影響產業經濟。近 20 年，該害蟲已發生於東非、中東及亞洲國家 (中國、東帝汶、印度、印尼及台灣等) (Li *et al*. 2003; Wang & Wang 2005; Zhao *et al*. 2005; Su *et al*. 2006; Cai *et al*. 2013; Shih *et al*. 2013; Zeng *et al*. 2014)。至今，台灣雖有檬果壯鋏普癭蚋相關的生物學研究，如 Hao & Shih (個人通訊) 指出其於台灣每年具 6–7 個世代，Lin *et al*. (2018) 記錄害蟲與蟲癭發育的對照時期、蟲癭的分布偏好及物理特性。然其防治策略除化學防治方式之外，其他防治策略資料仍缺乏。

許多研究報告顯示，造癭癭蚋族群動態及其生態特性會受到寄生蜂影響 (Redfern & Cameron 1978; Sunose 1985; Yukawa & Rohfrisch 2005)。本研究針對檬果壯鋏普癭蚋的寄生蜂 *Aprostocetus* sp. (圖 1) 進行寄生率調查、寄生行為、成蟲室內條件飼養比較，以評估其作為天敵防治資材之可行性。

投稿日期：2019 年 3 月 20 日；接受日期：2019 年 5 月 10 日。
[*] 通訊作者：hao@fthes-tari.gov.tw
[1] 國立中興大學昆蟲學系博士生。台灣 台中市。
[2] 高雄市立明華國中學生。台灣 高雄市。
[3] 國立中興大學昆蟲學系教授。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 高雄市。

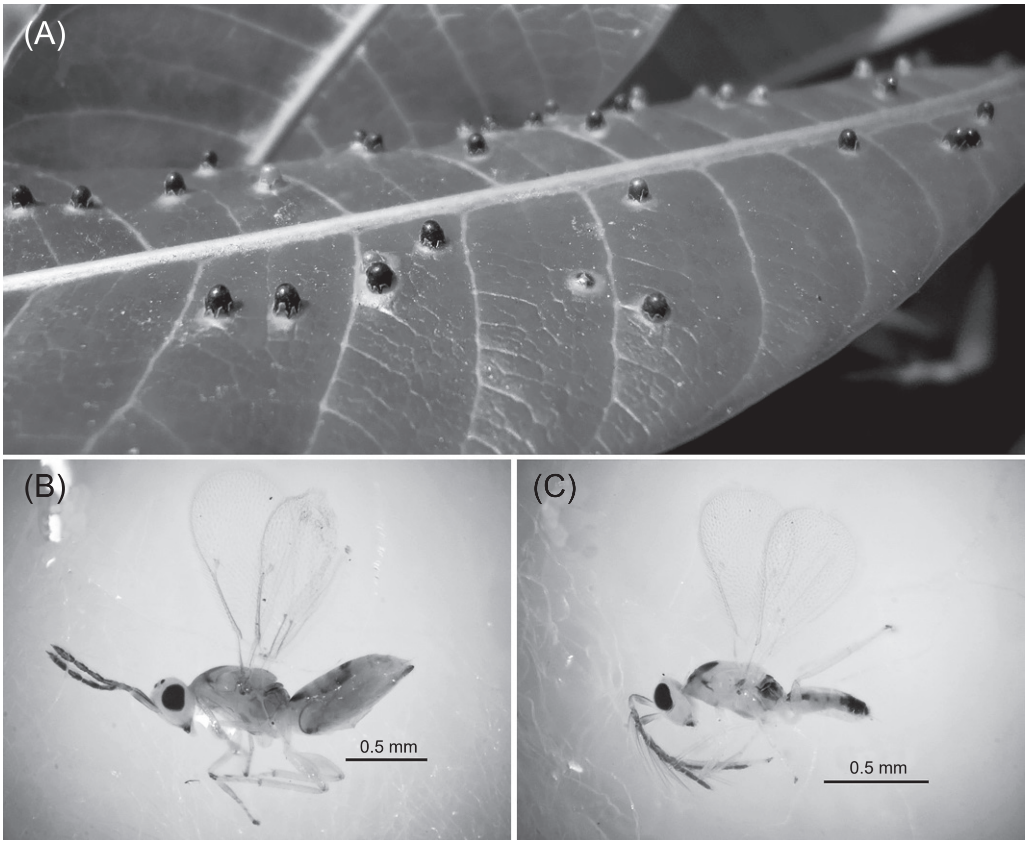


**圖 1.** 檬果壯鋏普癭蚋蟲癭及其寄生蜂 (*Aprostocetus* sp.)。(A) 蟲癭、(B) 寄生蜂雌蟲及 (C) 寄生蜂雄蟲。
**Fig. 1.** *Procontarinia robusta* midge gall (A) and its parasitic *Aprostocetus* sp. female (B) and male (C).

# 材料與方法

## 調查地點、檬樹及蟲癭發生情形

調查之檬果檬樹選自高雄市立明華國民中學校園 (N 22.661338, E 120.301073，以下稱為學校檬點) 4 株及行政院農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所 (N 22.642635, E 120.358871，以下稱為鳳試所檬點) 36 株檬果樹，樹高約為 1.5–3.0 m。試驗採樣的檬果葉片上的蟲癭密度，每葉平均超過 60 個蟲癭。

## *Aprostocetus* sp. 寄生率

本研究以寄生在檬果壯鋏普癭蚋之寄生蜂 *Aprostocetus* sp. 為調查對象，在上述兩檬區分別於 2015 年 4 月採樣 30 片著癭葉及 10 月採樣 12 片著癭葉，計算蟲癭數量及被寄生率。此外，於 2015 年 10 月在學校檬點隨機採集 30 片著癭葉，進行解剖並計算被寄生率，探討寄生率與蟲癭數量之相關。

## *Aprostocetus* sp. 寄生時期及行為

依 Lalonde & Shorthouse (1984)、Rohfritsch (1992) 及 Yang (1999) 對於蟲癭發育時期的定義。選取檬果壯鋏普癭蚋蟲癭的初始形成期 (initiation stage)、成長分化期 (growth and differentiation stage) 及定型成熟期 (maturation stage) 進行寄生蜂寄生時期測試。於鳳試所檬點，選擇上述 3 時期的蟲癭葉片各 3 片，每片葉片包含超過 60 個蟲癭，分別以網袋包覆。待套網內葉片蟲癭發育為定型成熟期後 1 wk，將蟲癭解剖並記錄寄生率，進行 3 重覆。

在鳳試所檬點採集向光及背光著癭葉各 9 片，記錄兩者葉片蟲癭數量及解剖，比較二者

寄生率之差異，並以 PAST 3.06 (Hammer *et al*. 2001) 進行 Kruskal-Wallist 測試比較。

寄生蜂產卵位置：於兩樣區分別選擇具有初始形成期及成長分化期的蟲癭葉片 6 片，每片葉片包含超過 80 個蟲癭，分成葉背包覆組 (以網袋包覆葉背) 及葉面包覆組 (以網袋包覆其葉面) (圖 2)。每組各包含 3 片著癭葉，待蟲癭發育至定型成熟期後 1 wk，取回並解剖記錄，計算寄生率並比較兩組之差異。

寄生蜂離癭位置：於鳳試所及學校樣點分別選擇定型成熟期著癭葉各 6 片，分成葉背包覆組 (以網袋包覆葉背) 及葉面包覆組 (以網袋包覆其葉面)，每組各包含 3 片著癭葉，記錄 2 組寄生蜂的羽化數量。

### *Aprostocetus* sp. 成蟲室內條件飼養

解剖檬果壯鋏普癭蚋蟲癭，將取得的寄生蜂幼蟲或蛹，置於舖有衛生紙的小容器中飼養。將取得之成蜂分為 2 組並於室溫 (25℃ ± 2℃) 進行飼養試驗，一組不提供食物及水，另一組提供含有 20% 蜂蜜水之棉花球。記錄並比較兩組成蟲的存活日數。

## 結果

### *Aprostocetus* sp. 寄生率及其影響因子

*Aprostocetus* sp. 於學校樣點的寄生率為 17.26% (4 月) 及 18.56% (10 月)；於鳳試所樣點的寄生率為 14.47% (4 月) 及 11.76% (10 月) (表 1)。此外，每一葉片的蟲癭數量及寄生率相關性分析結果顯示，寄生蜂的寄生數量隨著蟲癭數量上升而增加，二者呈正相關 ($r$ = 0.785，$P$ < 0.001)，而寄生率卻隨著蟲癭數的增加而略顯下降，但兩者相關性低 ($r$ = -0.291，$P$ = 0.213) (圖 3)。

### *Aprostocetus* sp. 寄生偏好及行為

寄生蜂於蟲癭發育各時期套袋之寄生率，在初始形成期為 0% ($n$ = 340)、於成長分化期為 11.7% ($n$ = 316)、於定型成熟期為 21.0% ($n$

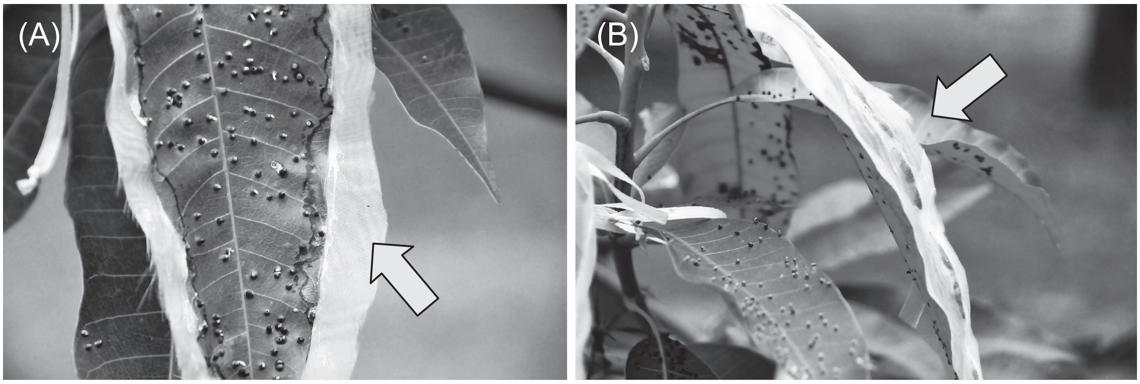


**圖 2.** *Aprostocetus* sp. 寄生偏好及其成蟲離癭試驗網袋包覆示意圖。(A) 葉背包覆組及 (B) 葉面包覆組。

**Fig. 2.** Experimental diagram of parasitize preference and adult emerge behavior of *Aprostocetus* sp. Meshed bag covers on (A) abaxial side and (B) adaxial side. Arrow indicates covered side.

**表 1.** *Aprostocetus* sp. 於檬果壯鋏普癭蚋之寄生率。

**Table 1.** Parasitism of *Aprostocetus* sp. on *Procontarinia rubasta*.

| | April 2015 | | October 2015 | |
|---|---|---|---|---|
| Sampling locality[z] | No. of gall | Parasitism (%) | No. of gall | Parasitism (%) |
| MH | 2,335 | 403 (17.26%) | 1,907 | 354 (18.56%) |
| FS | 2,467 | 357 (14.47%) | 2,006 | 236 (11.76%) |

[z]MH: Minghua Junior High School; FS: Fengshan Tropical Horticultural Branch, Taiwan Agricultural Research Institute.

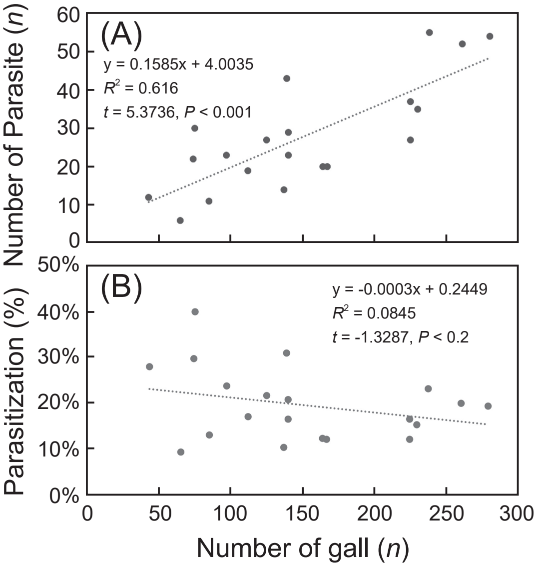


**圖 3.** 檬果壯鋏普癭蚋蟲癭數量與 *Aprostocetus* sp. (A) 寄生數量及 (B) 寄生率之關聯。

**Fig. 3.** The correlation of gall number of *Procontarinia robusta* to (A) parasitized number ($n$) and (B) parasitization (%) of *Aprostocetus* sp.

= 276)；於向光面及背光面的寄生比率分別為 19.3% ± 3.2% ($n$ = 9) 及 4.9% ± 2.6% ($n$ = 9)，兩者具顯著差異 (表 2)。

在寄生蜂產卵位置試驗，葉背 (葉面包覆組) 蟲癭的寄生率於鳳試所及學校分別為 12.5% 及 18.8%，葉面 (葉背包覆組) 的蟲癭寄生率於兩樣點均為 0 (表 3)。在寄生蜂離癭位置試驗，網袋包覆葉面組及網袋包覆葉背組均可蒐集到寄生蜂，前者組別於兩樣點之蒐集及寄生蜂數量分別為 9.0 ± 3.6 ($n$ = 3，鳳試所樣點) 及 9.6 ± 2.1 ($n$ = 3，學校樣點)；後者組別之寄生蜂數量分別為 5.3 ± 2.1 ($n$ = 3，鳳試所樣點) 及 6.0 ± 2.0 ($n$ = 3，學校樣點)。

## *Aprostocetus* sp. 室內條件飼養

剛羽化的成蜂於無食物供給狀態下可存活 4 d ± 1 d ($n$ = 12)，另給予 20% 蜂蜜水的組別可存活 9 d ± 1 d ($n$ = 12)，兩者呈顯著差異 ($P$ < 0.05)。

# 討論

## *Aprostocetus* sp. 寄生率

天敵的寄生效力，對於害蟲族群的生物防治是不可或缺的資訊，選擇合適的天敵物種，方能提高防治效益及降低防治成本。例如為害板栗 (*Castanea mollissima* Blume) 作物的板栗癭蜂 (*Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu)，雖然於不同的國家發現數種天敵寄生蜂，但除了中華長尾小蜂 (*Torymus sinensis* Kamijo) 因具有高專一寄生性，被選為生物防治天敵之外，其他物種則因為寄生率均不超過 2% 而不受青睞 (Payne 1978; Murakami *et al*. 1980; Kamijo 1982; Murakami 1983; Huang *et al*. 1988; Aebi *et al*. 2006; Abe *et al*. 2007; Cooper & Rieske 2007; Quacchia *et al*. 2013a, 2013b)。以本研究而言，*Aprostocetus* sp. 於兩樣區的寄生率都在 10% 以上，最高甚至達到 18.56%。此外，*Aprostocetus* sp. 寄生數量隨著癭蚋蟲癭數量的增加而上升，即使寄生比率有略降，但統計結果指出蟲癭數量及被寄生率之相關性不顯著 ($P$ = 0.213)。顯示天敵寄生率在癭蚋致死因子中占一定比例，對檬果壯鋏普癭蚋族群具有一定的抑制效果，具有發展為良好的生物防治天敵之潛力，亦可配合其他防治方法施行綜合防治。

## *Aprostocetus* sp. 寄生偏好及行為

Yukawa & Rohfrisch (2005) 將癭蚋的寄

**表 2.** *Aprostocetus* sp. 於向光面及背光面蟲癭之寄生數量及寄生率。

**Table 2.** Parasitism of *Aprostocetus* sp. on apricus and downsun branch.

| Sampling branch | No. of gall per leaf | Parasitism (%) |
|---|---|---|
| Apricus branch ($n$ = 9) | 181.0 ± 64.5 a[z] | 35.3 ± 14.1 (19.3 ± 3.2%) a |
| Downsun branch ($n$ = 9) | 31.3 ± 9.2 b | 11.6 ± 1.10 (4.9 ± 2.6%) b |

[z]Means in the same column marked with the different letters are significantly different according to Kruskal-Wallist test ($P$ < 0.050).

表 3. *Aprostocetus* sp. 於檬果壯鋏普癭蚋蟲癭於葉片之寄生偏好。

**Table 3.** Leaf side preference of parasitic preference of *Aprostocetus* sp. on *Procontarinia robusta* gall.

| Sampling locality[z] | Abaxial side ($n$ = 3) | Adaxial side ($n$ = 3) |
|---|---|---|
| MH | 20.3 ± 2.1 (18.8 ± 2.6%) | 0 (0%) |
| FS | 13.7 ± 2.1 (12.5 ± 3.1%) | 0 (0%) |

[z] MH: Minghua Junior High School; FS: Fengshan Tropical Horticultural Branch, Taiwan Agricultural Research Institute.

生蜂分為兩類型，第一類是內寄生及單食性寄生蜂，主要寄生癭蚋的卵期及初齡幼蟲，如廣腹細蜂、旋小蜂及廣肩小蜂；另一類則為行外寄生及食性較廣的姬蜂及長尾小蜂物種，主要寄生較晚期或成熟的幼蟲齡期。*Aprostocetus* sp. 偏好寄生於成長分化期及定型成熟期蟲癭，顯示其應屬於寄生幼蟲後期齡期之類型。成長分化期的蟲癭寄生率偏低 (11.7%)，推論此時期僅有少部分的癭蚋已發育為體型較大的幼蟲，然而定型成熟期蟲癭的寄生率高 (21.0%)。顯示直至蟲癭發展後期，仍有寄生活動發生，其寄生的癭蚋齡期可能包含癭蚋 2 齡幼蟲期至蛹期階段。Chein & Ku (2001) 指出非洲菊斑潛蠅的 5 種寄生蜂 (4 種釉小蜂及 1 種繭蜂) 對其寄主幼蟲齡期具選擇性，主要寄生 3 齡幼蟲時期。此外，4 種釉小蜂的子代雌性比會受寄主齡期影響。未來可進一步測試 *Aprostocetus* sp. 的子代雌性比在寄生不同寄主齡期是否有差異，以降低偏雄現象 (雄蟲比例過高)，避免增加防治及飼養成本 (Chow & Heinz 2005)。

寄生蜂搜尋行為乃其重要的存活能力之一，除了以視覺定位寄主之外，有時亦會利用寄主取食植物寄主所產生的揮發物質來進行定位 (Fellowes *et al*. 2005)。Wang & Yang (2008) 指出多數寄生蜂會以視覺或化學訊號來確認遠距離的寄主方位，再以聽覺、嗅覺確認寄主的確切位置。但寄生蜂的寄生行為有時於野外觀察不易，本研究藉由寄生偏好測試確認 *Aprostocetus* sp. 僅由蟲癭底部 (= 葉背) 進行寄生，但可由蟲癭底部 (= 葉背) 或端部 (= 葉面) 的位置離癭，且其於葉面/葉背的離癭的比例約為 1.5 倍，顯示寄生蜂的離癭位置較偏好於葉面離癭。目前，仍無法確認寄生蜂離癭行為的機制，但本研究結果顯示可藉由蟲癭的生態資訊提供寄生蜂寄生行為之判斷。

Lin *et al*. (2018) 證實檬果壯鋏普癭蚋於向光面的蟲癭數量較背光面高，本研究結果 *Aprostocetus* sp. 的寄生亦有類似的情形，顯示相同的環境中，其寄生偏好亦會受到不同微環境因子的影響。如向光或背光處的光照強度不同，未來可進一步確認光照因子或顏色對於寄生蜂誘引的程度，或可作為誘集寄生蜂或降低生物天敵干擾之資訊。

## *Aprostocetus* sp. 成蟲室內飼養

Price (1974) 提出寄生蜂產卵及卵的形成主要分為兩種型式，原定式產卵 (proovigenic) 及應變式產卵 (synovigenic)。行前者型式之寄生蜂，雌蟲多為壽命及產卵期短、日產卵數變化大、無取食寄主食性、排卵自發性且於羽化時體內的卵皆已成熟；反之，行後者型式之寄生蜂，雌蟲壽命及產卵期較長、可藉由取食寄主獲得營養或提供卵之成熟及形成、其排卵受外界因子影響、其初羽化成蟲體內可能僅含少數成熟卵、可藉由卵吸收來調節產卵時機。如 Chien & Chang (2013) 顯示寄生斑潛蠅的 4 種釉小蜂 [異角釉小蜂 *Hemiptarsenus varicornis* (Girault)、華釉小蜂 *Neochrysocharis formosa* (Westwood)、底比斯釉小蜂 *Chrysoncharis pentheus* (Walker)、岡崎釉小蜂 *Closterocerus okazakii* (Kamijo)] 即是應變式產卵型式的寄生蜂物種，在無寄主可寄生時會藉由卵吸收的方式，保存生殖資源並調節產卵時機，但產卵調節的策略受成蟲的壽命影響。若能另提供蜜源植物，可延長 4 種釉小蜂的壽命，進而提升寄生蜂對斑潛蠅的抑制成效。本研究雖無法直接判定 *Aprostocetus* sp. 是屬於何種產卵型式的寄生蜂，但藉由取食蜂蜜可延長其存活天數之結果，或可推測其為應變式產卵型式之寄生蜂。

未來可進行其卵量計算及相關測試，確立其產卵型式，以供生物防治發展作為參考。

## 誌謝

本研究以第二及第三作者於 2015 年與 2016 年參加國中科學展覽 (主題分別為「『癭』室了得，硬是了得！探討檬果壯鋏普癭蚋的生態及生物防治可行性」及「捕『蜂』捉『癭』── 探討一種未知寄生蜂的生態及對檬果壯鋏普癭蚋寄生模式」) 之部分資料為基礎，由其他共同作者指導並進行彙整、分析、詮釋及轉寫。研究期間承高雄市立明華國民中學林品汝、倪羽薇、劉珈琳、李奕萱、蘇育弘、李冠徵協助調查採樣及整理數據。文成後，感謝中興大學邱俊禕先生於統計分析之協助、美國農業部 (United States Department of Agriculture) 唐昌廸博士及林業試驗所潘亮瑜博士提供文章修正建議及文稿斧正。

## 引用文獻

Abe, Y., G. Melika, and G. N. Stone. 2007. The diversity and phylogeography of cynipid gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae) of the oriental and eastern Palearctic regions, and their associated communities. Orient. Insects 41:169–212.

Aebi, A., K. Schönrogge, G. Melika, A. Alma, G. Bosio, A. Quacchia, L. Picciau, Y. Abe, S. Moriya, K. Yara, and G. Seljak. 2006. Parasitoid recruitment to the globally invasive chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus*. p.103–121 *in*: Galling Arthropods and Their Associates: Ecology and Evolution. (Ozaki, K., J. Yukawa, T. Ohgushi, and P. W. Price, eds.) Springer Japan. Tokyo, Japan. 308 pp.

Cai, H. J., P. Kolesik, H. Y. Wang, F. R. Liao, V. Quintao, F. M. Harris, and G. A. Bellis. 2013. Description of the immature stages and gall morphology, and molecular characterisation of *Procontarinia robusta*, a gall midge (Diptera: Cecidomyiidae) damaging leaves of mango *Mangifera indica* L. (Anarcadiaceae) in southern Asia. Aust. J. Entomol. 52:206–211.

Chien, C. C. and S. C. Ku. 2001. Instar preference of five species of parasitoids of *Liriomyza trifolii* (Hymenoptera: Eulophidae, Braconidae). Formosan Entomol. 21:89–97. (in Chinese with English abstract)

Chien, C. C. and S. C. Chang. 2013. Oosorption in four eulophid wasps (Hymenoptera: Eulophidae) parasitic on leaf miners (Diptera: Agrimyzidae). J. Taiwan Agric. Res. 62:32–39. (in Chinese with English abstract)

Chow, A. and K. M. Heinz. 2005. Manipulation of sex ratios in mass rearing of *Diglyphus isaea* (Walker), an ectoparasitoid of Agromyzid leafminers. IOBC WPRS Bull. 28:63–66.

Cooper, W. R. and L. K. Rieske. 2007. Community associates of an exotic gallmaker, *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae), in eastern North America. Ann. Entomol. Soc. Amer. 100:236–244.

Fellowes, M. D. E., J. J. M. van Alphen, and M. A. Jervis. 2005. Foraging behaviour. p.1–17. *in*: Insects as Natural Enemies: A Practical Perspective. (Jervis, M. A., ed.) Springer. Dordrecht, the Netherlands. 748 pp.

Hammer, Ø., D. A. T. Harper, and P. D. Ryan. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontol. Electron 4:1–9.

Huang, J., Y. Luo, and D. Liao. 1988. Studies on the natural enemies of chestnut gall wasp in China. Scientia Silvae Sinicae 24:162–169. (in Chinese)

Kamijo, K. 1982. Two new species of *Torymus* (Hymenoptera, Torymidae) reared from *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera, Cynipidae) in China and Korea. Kontyu 50:505–510.

Lalonde, R. G. and J. D. Shorthouse. 1984. Developmental morphology of the gall of *Urophora cardui* (Diptera, Tephritidae) in the stems of Canada thistle (*Cirsium arvense*). Can. J. Bot. 62:1372–1384.

Li, J., W. J. Bu, and Q. Y. Zhang. 2003. A new species of gall midge (Diptera: Cecidomyiidae) attacking mango leaves from China. Acta. Zootax. Sin. 28:148–151.

Lin, S. F., P. R. Lin, Y. W. Ni, M. M. Yang, and H. H. Hao. 2018. Gall development, structure and preference position of the invasive cecidomyiid *Procontarinia robusta* Li, Bu & Zhang (Diptera: Cecidomyiidae). Formosan Entomol. 38:84–91. (in Chinsese)

Murakami, Y., H. B. Ao, and C. H. Chang. 1980. Natural enemies of the chestnut gall wasp in Hopei Province, China: Hymenoptera: Chalcidoidea. Appl. Entomol. Zool. 15:184–186.

Murakami, Y. 1983. Comparison of the adult emergence periods between *Torymus* (*Syntomaspis*) *beneficus*, a native parasitoid of the chestnut gall wasp and a congeneric parasitoid imported from China (Hymenoptera: Torymidae). Proc. Assoc. Plant Prot. Kyushu 27:156–158. (in Japanese)

Payne, J. A. 1978. Oriental chestnut gall wasp: New nut pest in North America. p.86–88. *in*: Proceedings of

the American Chestnut Symposium. January 4–5, 1978. Morgantown, WV. West Virginia Univ. Press, Morgantown, WV.

Price, P. W. 1974. Strategies for egg production. Evolution 28:76–84.

Quacchia, A., S. Moriya, and G. Bosio. 2013a. Effectiveness of *Torymus sinensis* in the biological control of *Dryocosmus kuriphilus* in Italy. Acta. Hort. 1043:199–204.

Quacchia, A., C. Ferracini, J. A. Nicholls, E. Piazza, M. A. Saladini, F. Tota, G. Melika, and A. Alma. 2013b. Chalcid parasitoid community associated with the invading pest *Dryocosmus kuriphilus* in north western Italy. Insect Conserv. Diver. 6:114–123.

Redfern, M. and R. A. D. Cameron. 1978. Population dynamics of the yew gall midge *Taxomyia taxi* (Inchbald) (Diptera: Cecidomyiidae). Ecol. Entomol. 3:251–263.

Rohfritsch, O. 1992. Patterns in gall development. p.60–86. *in*: Biology of Insect-Induced Galls. (Shorthouse, J. D. and O. Rohfritsch, eds.) Oxford University Press. New York, NY. 285 pp.

Shih, H. T., H. H. Hao, Y. C. Chiu, F. C. Lin, and M. M. Yang. 2013. A revised and annotated checklist of insects and mites of mangos from Taiwan. Formosan Entomol. 33:27–51. (in Chinese)

Su, Y., W. Zhang, J. Wang, and H. Wang. 2006. Studies on the damage and the chemical control of *Procontarinia robusta* at Xiamen. Fujian Sci. Tech. Tropical Crop. 31(3):1–3. (in Chinese)

Sunose, T. 1985. Population regulation of the euonymus gall midge *Masakimyia pustulae* Yukawa and Sunose (Diptera: Cecidomyiidae) by hymenopterous parasitoids. Res. Popul. Ecol. 27:287–300.

Wang, W. X. and H. Y. Wang. 2005. A preliminary report on biological characters of *Procontarinia robusta* in mango. Fujian J. Agric. Sci. 20:74–76. (in Chinese)

Wang, X. and Z. Yang. 2008. Behavioral mechanisms of parasitic wasps for searching concealed insect hosts. Acta. Ecol. Sin. 28:1257–1269.

Yang, M. M. 1999. The Biology and evolution of gall-forming insects. p.113–126. *in*: Proceedings of the Symposium on Insect Systematic and Evolution. May 20–21, 1999. Taipei, Taiwan. National Taiwan University and National Museum of Natural Science, Taipei. (in Chinese with English abstract)

Yukawa, J. and O. Rohfrisch. 2005. Biology and ecology of gall-inducing cecidomyiidae. p.274–304. *in*: Biology, Ecology, and Evolution of Gall-Inducing Arthropods. (Ramna, A., C. W. Schaefer, and T. M. Withers, eds.) Science Publishers. Enfield, NH. 817 pp.

Zeng, C., Y. L. Li, R. R. Xiao, L. X. Huang, Y. D. Robleh, A. A. Bourhan, and Y. Peng. 2014. Preliminary study on *Procontarinia robusta*, one kind of pest of mango tree, in Djibouti. J. Hubei Univ. (Natural Science) 36:303–306. (in Chinese)

Zhao, J. H., M. Xia, and Z. H. Zeng. 2005. Occurrence and control of *Procontarinia mangicola* (Shi). Sci. Tech. Sichuan Agric. 1:35. (in Chinese)

# Parasitic Behavior of a Potentially Natural Enemy, *Aprostocetus* sp. (Hymenoptera: Eulophidae), on Mango Pest Cecidomyiid *Procontarinia robusta* (Diptera: Cecidomyiidae)

Sheng-Feng Lin[1], Shi-Shun Wang[2], Ang-Shing Lee[2], Man-Miao Yang[3], and Hsiou-Hua Hao[4,*]

## Abstract

Lin, S. F., S. S. Wang, A. S. Lee, M. M. Yang, and H. H. Hao. 2019. Parasitic behavior of a potentially natural enemy, *Aprostocetus* sp. (Hymenoptera: Eulophidae), on mango pest cecidomyiid *Procontarinia robusta* (Diptera: Cecidomyiidae). J. Taiwan Agric. Res. 68(3):246–253.

The investigations on the parasitism and ovipositional behavior of *Aprostocetus* sp. were done on mango pest cecidomyiid, *Procontarinia robusta*, in providing fundamental information for developing biocontrol tactics. The parasitism was 11–19% at two sampling localities of Kaohsiung City in April and October 2015. Number of galls per leaf is positively correlated to the number of parasites per leaf ($r$ = 0.785, $P$ < 0.001) but insignificantly correlated to the percentage parasitization ($r$ = -0.291, $P$ = 0.213). It indicates that parasitism is not affected by population size of *P. robusta*. Besides, the parasitism of gall on apricus branch (19.3% ± 3.2%, $n$ = 9) is significantly higher than that on downsun branch (4.9% ± 2.6%, $n$ = 9), indicating the parasitism is influenced by environmental factor. The ovipositional phase of *Aprostocetus* sp. is associated with growth and differentiation stage and maturation stage of midge gall. The adult wasp lays the egg on abaxial side of leaf and most emergent adult leaves gall from adaxial side of leaf. The longevity of adult wasp treated with 20% honey water (9 d ± 1 d, $n$ = 12) is higher than those in the treatment with no food (4 d ± 1 d, $n$ = 12). The results showed that planting nectar plants could have positive biological control effect by prolonging the longevity of the *Aprostocetus* parasitoid. The biological rhythm and release test of *Aprostocetus* sp. is needed to evaluate biocontrol effectiveness of natural enemy on *P. robusta* in further studies.

**Key words:** *Procontarinia robusta*, *Aprostocetsu* sp., Parasitic phase, Ovipositor behavior, Biological control.

Received: March 20, 2019; Accepted: May 10, 2019.
[*] Corresponding author, e-mail: hao@fthes-tari.gov.tw
[1] Ph.D. Student, Department of Entomology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Student, Kaohsiung Municipal Minghua Junior High School, Kaohsiung, Taiwan, ROC.
[3] Professor, Department of Entomology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
[4] Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Fengshan Tropical Horticultural Experimental Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 68(3):254–260 (2019)
DOI:10.6156/JTAR.201909_68(3).0007

Short Communication

# An Efficient Method for the Collection of Coffee Berry Borer [*Hypothenemus hampei* (Ferrari)] Adults

Tai-Chuan Wang[1], Zi-Xuan Cheng[2], and Yu-Ping Liang[1,*]

## Abstract

Wang, T. C., Z. X. Cheng, and Y. P. Liang. 2019. An efficient method for the collection of coffee berry borer [*Hypothenemus hampei* (Ferrari)] adults. J. Taiwan Agric. Res. 68(3):254–260.

The coffee berry borer (CBB) [*Hypothenemus hampei* (Ferrari)] is one of the most serious coffee pests worldwide. Existing methods to collect CBB adults from infested coffee berries are extremely labor intensive and time consuming. In order to develop an productive technique to collect CBBs, a commercial insect breeder was selected as a prototype of the collection device to evaluate the effectiveness of the additional bridge, the bridge texture, and light source of the device. The results showed that the device had the optimal collection efficiency when a strip of paper was added as a bridge to connect the berries in the bottom container to the top collection cup, and when the funnel and the bottom container were covered with aluminum foil to make the light source come only from the top, while the textures of the paper bridge had mininal effect on collection efficiency. This modified collection device provides a better way to collect CBB adults for further research or applications.

**Key words:** Coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, Collection method.

## INTRODUCTION

The coffee berry borer (CBB), *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), is one of the most serious pests in coffee plantations worldwide (Damon 2000; Jaramillo *et al*. 2006; Vega *et al*. 2009; Pérez *et al*. 2015). The CBB causes large economic losses on coffee plantations, which was estimated over US$500 million dollars annually around the world (Vega *et al*. 2002). Adult females bore a hole into the endosperm of the coffee seed and deposit their eggs inside the berry, and the larvae feed on the coffee seed until the resource is depleted. The CBB was first discovered in Taiwan in 2007 (Lin *et al*. 2010), and its population had spread exponentially afterwards throughout coffee growing areas in western parts of Taiwan nowadays, inculding Townships of Gukeng, Dongshan, Alishan, Yuchi, Shuili, Meishan and Zhongpu, causing serious damage (unpublishied data).

Field collection is one of the important steps for starting research on agricultural pests. Different types of collection devices were developed to collect specific pests based on the life cycles, behaviors, and habits of the insects (Cloyd *et al*. 2001; Doğramaci *et al*. 2011; Thomas 2012). One of the previously reported methods to collect CBBs from the field was tearing apart the infested coffee berries and picking up each CBB by featherweight forceps

Received: November 28, 2018; Accepted: March 14, 2019.
* Corresponding author, e-mail: yupingliang@dns.caes.gov.tw
1 Assistant Research Fellows, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.
2 Research Assistant, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

(Brun *et al*. 1989, 1993). However, this method was labor intensive and time consuming, due to the tiny body size (*ca*. 1.4–1.7 mm in length) of the CBB (Mitchell & Maddox 2010), and tearing the berries often harmed the CBBs and decreased the survival rate of individuals for further study. The other method to collect CBB from infested berries was using a series of sieves with different mesh sizes to separate CBBs from berry fragments and CBB feces when the females were leaving the berries, and then picking them up by forceps. This method was hardly feasible due to the unpredictability regarding timing of leaving of berries for the female. It is equally time consuming to collect the adults by forceps. Concerning the disadvantages of these methods, this study attempted to develop a more convenient method to facilitate CBB collection from infested berries.

# MATERIALS AND METHODS

## Source of insects

The CBB-infested dry coffee berries retained on the trees were collected in non-insecticide usage coffee orchards in Townships of Meishan and Zhongpu, Chiayi County. The CBBs outside the berries were removed by sieving with baskets (38.5 cm × 31.0 cm × 10.0 cm, I400, Chen Jung Plastic Co., Ltd., Tainan, Taiwan).

## The design of the collection device

The Mini Insect Breeder (BD7001, Mega-View Science Co., Ltd., Taichang, Taiwan), which consisted of a bottom container, a funnel, and a top collection cup (Fig. 1A), was used as the prototype of the collection device. Three experiments were conducted to evaluate the effects of the additional bridge, bridge textures, and the light source on collecting CBB adults. For each experiment, 500 infested coffee berries were placed in the bottom container and the collecting period started from 10:00 a.m. to 4:00 p.m. At the end of the collection, CBB adults in the top collection cups (Fig. 1B) were immersed in 75% alcohol and the numbers of CBBs were counted.

In the first experiment, a strip of qualitative filter paper (No. 1, 185 mm, Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan; cut into 1 cm × 17 cm) was put inside the device to connect the bottom container and the top collection cup (Fig. 1A), and an identical device without the paper bridge was used as the control. There were four replicates for this experiment.

In the second experiment, qualitative filter paper, bristol board (200 pound, white wood free paper, Xin Guan Stationery Co., Ltd., Changhua, Taiwan) and copy paper (800 gsm, double A, Advance Paper Co., Ltd., Caloocan, Philippines) were used as the paper bridge of the device to evaluate the effect of its texture on collecting CBB adults. There were three replicates in this experiment.

To evaluate the effect of light on collection efficiency, in the third experiment, the bottom container and the funnel of the device were covered with aluminum foil, and a strip of qualitative filter paper was used as the bridge (Fig. 1D). An identical device without the aluminum foil was used as the control. There were four replicates for this experiment.

## Statistical analysis

All analyses were performed with SAS Enterprise Guide 7.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Student's *t*-test was used to examine differences between the means of the number of CBBs collected by the device with or without a paper strip and aluminum foil. The effects of paper bridge textures were examined through an analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's least significant difference (LSD) test. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

# RESULTS AND DISCUSSION

## Effect of the bridge on collecting CBB adults

The results showed that the addition of the bridge in the device had significant advance-

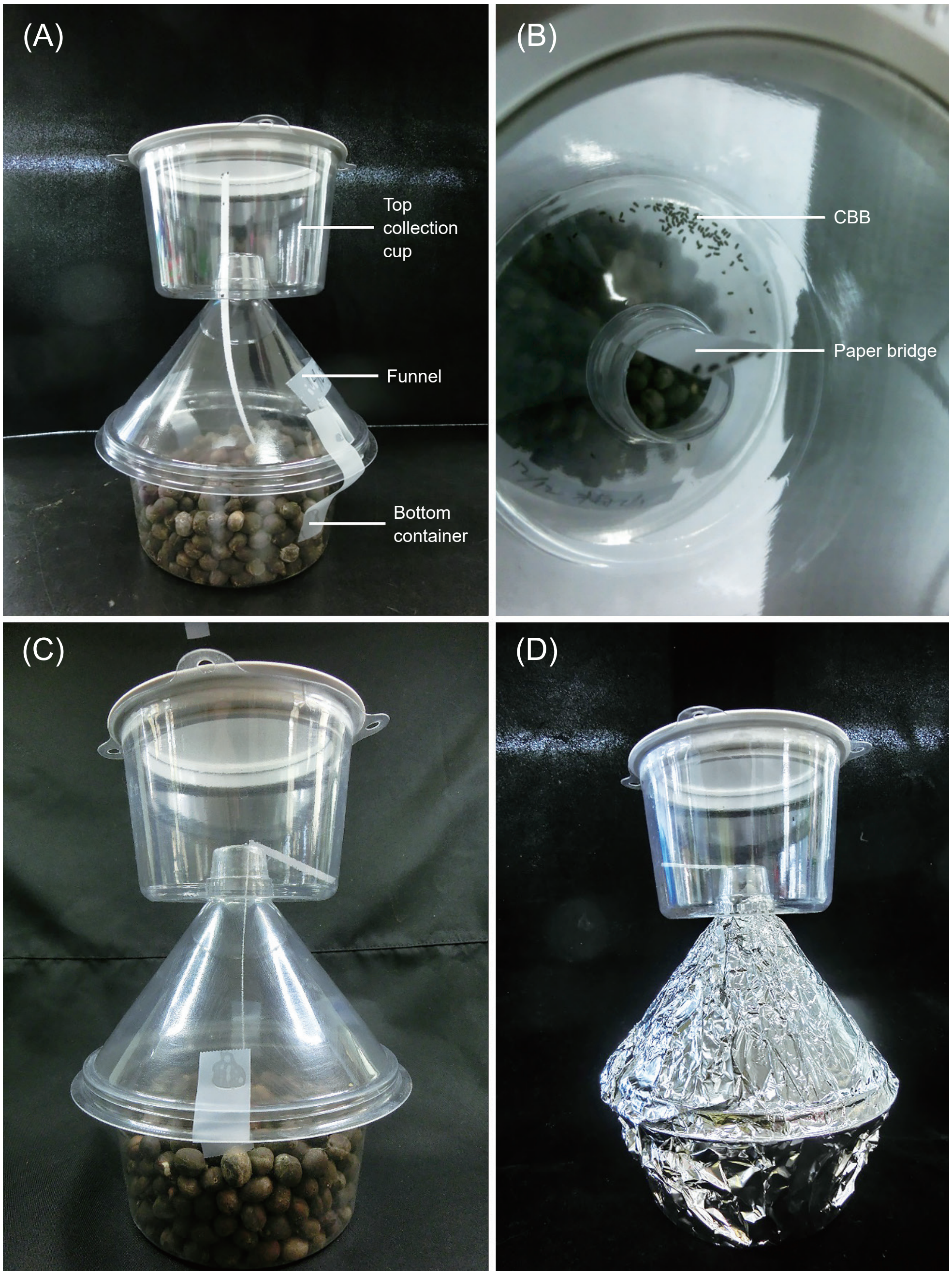


**Fig. 1.** The rapid collection device consisted of a Mini Insect Breeder with a paper strip as a bridge (A); coffee berry borers (CBB) climbed the paper strip to the top collection cup (B); bending the paper strip into "L" shape could avoid it from slipping down (C); and covering the funnel and the bottom container with aluminum foil could increase the collection efficiency (D).

ments in CBB collection efficiency. The device without a bridge only collected 14.0 ± 2.2 CBB adults on average, while the device with a filter paper bridge inside collected 114.0 ± 12.6 CBB adults (Student's *t*-test, $P = 0.0035$) [Table 1(a)].

**Table 1.** Means (± SE) of coffee berry borer adults collected from the device with or without a bridge (a), with different paper bridges (b), and covered with or without aluminum foil (c).

| Treatment | Number |
|---|---|
| (a) No bridge | 14.0 ± 2.2 a[z] |
| Bridge | 114.0 ± 12.6 b |
| (b) Bristol board | 103.0 ± 12.6 a[y] |
| Copy paper | 118.0 ± 22.5 a |
| Filter paper | 106.0 ± 12.5 a |
| (c) No aluminum foil | 101.3 ± 27.8 a[z] |
| Aluminum foil | 229.0 ± 12.6 b |

[z] Means followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Student's *t*-test.

[y] Means followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher's least significant difference (LSD) test.

## Effect of bridge textures on collecting CBB adults

From the observation of the collecting process in the first experiment, we found that most CBB adults reached the top collection cup by climbing the paper bridge, while only a few of them reached directly by flying (Fig. 1B). Considering the texture of the paper bridge might affect its climbing ability, we further used two other cheaper and easily available kinds of paper to evaluate if the texture of the bridge could affect the collection efficiency. In this experiment, the device collected 103.0 ± 12.6, 118.0 ± 22.5, and 106.0 ± 12.5 CBB adults by using bristol board, copy paper and filter paper as the bridge, respectively. The number of collected CBB adults were not significantly different (LSD, $P = 0.8014$) [Table 1(b)], indicating that the textures of the bridges used in this study might have less effect on the collection efficiency.

A disadvantage of this device is the paper bridges used in this study could easily be softened by the moisture from coffee berries and then slipped down during the collection process. To overcome this problem, the paper strip should be bent into "L" shape and hung on the funnel (Fig. 1C).

## Effect of light on collecting CBB adults

During the first two experiments, we observed that CBB adults were slightly attracted to light, and they wandered on the transparent funnel instead of moving directly towards the top collection cup. Therefore, in the third experiment, the funnel and the bottom container of the device were covered with aluminum foil to concentrate the light source only on the passage towards the top collection cup. The results showed that the device covered with aluminum foil collected significantly more CBBs than the one without covered. The device without aluminum foil collected 101.3 ± 27.8 CBB adults on average, while the one covered with aluminum foil collected 229.0 ± 12.6 CBB adults (Student's *t*-test, $P = 0.0058$) [Table 1(c)]. The results supported the theory that the CBB is attracted to light. The use of opaque materials as bottom parts can serve as effective tool to maximize the collection efficiency.

In all experiments, the collected CBB adults were all female. A previous report suggested that the female to male ratio of CBB was 13 to 1 in Taiwan (Chu *et al*. 2017). Besides, female CBB adults leave originally infested coffee berries and attack new berries, while the males have degenerate wing and stay in the berries (Damon 2000). Therefore, it is reasonable that the device collected only the females. However, sometimes we found that very few male adults come out to the surface of infested coffee berries, which suggested that this collection device could possibly collect both female and male adults.

The experiments also revealed that 500 infested coffee berries could produce over 100 CBB adults within 6 h (Table 1), which indicated that leaving these infested berries in orchards could provide the source of re-infesting CBBs in the field. Therefore, these data suggested that eliminating infested dry berries could reduce the CBB population in the field (Aristizábal *et al*. 2011), and leaving fewer than 5 dry berries on each tree was recommded

to be an effectively cultural control method for the integrated pest management program for CBB in Colombia (Aristizábal *et al*. 2012, 2016).

## CONCLUSIONS

Based on the CBB's tendency to crawl up and towards light, a commercial insect breeder was modified by adding a paper bridge to connect the berries in the bottom container to the top collection cup, and covering the funnel and the bottom container with aluminum foil to focus the light source from the top. In contrast to existing picking and sieving methods, this novel collection device can easily separate CBB adults from infested coffee berries without time consuming or labor intensive processes, and has been proved to efficiently collect enough number of CBB adults from infested coffee berries. We suggest that this device could be applied in collecting CBB adults for mass rearing, pesticide efficacy trials, and other experiments which require a large number of CBB adults.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mr. Yi-Zhang Wen and Mr. Yue-Yao Zhan, who are the owners of Wen Family Organic Coffee Orchard and Taiwan For You Coffee Farm, respectively, providing dry infested coffee berries, Associate Professor Yu-Cheng Chen in Department of Hospital and Health Care Administration, Chia Nan University of Pharmacy and Science, for discussing data analysis and Assistant Professor Yu-Shin Nai in Department of Entomology, National Chung Hsing University, for giving valuable writing advice.

## REFERENCES

Aristizábal, L. F., M. Jiménez, A. E. Bustillo, and S. P. Arthurs. 2011. Monitoring cultural practices for coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) management in a small coffee farm in Colombia. Fla. Entomol. 94:685–687.

Aristizábal, L. F., O. Lara, and S. P. Arthurs. 2012. Implementing an integrated pest management program for coffee berry borer in a specialty coffee plantation in Colombia. J. Integ. Pest Mngmt. 3:G1–G5. doi:10.1603/IPM11006

Aristizábal, L. F., A. E. Bustillo, and S. P. Arthurs. 2016. Integrated pest management of coffee berry borer: Strategies from Latin America that could be useful for coffee farmers in Hawaii. Insects 7:6. doi:10.3390/insects7010006.

Brun, L. O., C. Marcillaud, V. Gaudichon, and D. M. Suckling. 1989. Endosulfan resistance in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) in New Caledonia. J. Econ. Entomol. 82:1311–1316.

Brun, L. O., V. Gaudichon, and P. J. Wigley. 1993. An artificial diet for continuous rearing of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). Intl. J. Trop. Insect Sci. 14:585–587.

Chu, Y. F., M. H. Yang, S. F. Chang, P. H. Chen, and T. C. Wang. 2017. The composition of life satges of coffee berry borer (Scolytidae: *Hypothenemus hampei*) in the coffee berry and the control efficacy of different insecticides for the pest. J. Taiwan Agric. Res. 66:318–325. (in Chinese with English abstract)

Cloyd, R. A., D. F. Warnock, and K. Holmes. 2001. Technique for collecting thrips for use in insecticide efficacy trials. HortScience 36:925–926.

Damon, A. 2000. A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Bull. Entomol. Res. 90:453–465.

Doğramaci, M., J. Chen, S. P. Arthurs, C. L. McKenzie, F. Irizarry, K. Houben, M. Brenan, and L. Osborne. 2011. Mini-aspirator: A new device for collection and transfer of small arthropods to plants. Fla. Entomol. 94:22–27.

Jaramillo, J., C. Borgemeister, and P. Baker. 2006. Coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae): Searching for sustainable control strategies. Bull. Entomol. Res. 96:223–233.

Lin, M. Y., Y. F. Wu, and S. K. Chen. 2010. Monitoring survey of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* and its control. Bull. Tainan Dist. Agric. Res. Ext. Sta. 56:35–44. (in Chinese with English abstract)

Mitchell, A. and C. Maddox. 2010. Bark beetles (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) of importance to the Australian macadamia industry: An integrative taxonomic approach to species diagnostics. Aust. J. Entomol. 49:104–113.

Pérez, J., F. Infante, and F. E. Vega. 2015. A coffee berry borer (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) bibliography. J. Insect Sci. 15:83. doi:10.1093/jisesa/iev053

Thomas, D. B. 2012. Comparison of insect vacuums for sampling Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) on citrus trees. Southwest. Entomol. 37:55–60.

Vega, F. E., R. A. Franqui, and P. Benavides. 2002. The presence of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Puerto Rico: Fact or fiction? J. Insect Sci. 2:13. doi:10.1093/jis/2.1.13

Vega, F. E., F. Infante, A. Castillo, and J. Jaramillo. 2009. The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): A short review, with recent findings and future research directions. Terr. Arthropod Rev. 2:129–147.

# 一個有效率地收集咖啡果小蠹成蟲 [*Hypothenemus hampei* (Ferrari)] 的方法

王泰權 [1]　程子軒 [2]　梁鈺平 [1,*]

## 摘要

王泰權、程子軒、梁鈺平。2019。一個有效率地收集咖啡果小蠹成蟲 [*Hypothenemus hampei* (Ferrari)] 的方法。台灣農業研究 68(3):254–260。

咖啡果小蠹 [*Hypothenemus hampei* (Ferrari)] 為咖啡生產過程中危害最嚴重的全球性害蟲之一。以往自受害咖啡果實中收集咖啡果小蠹成蟲之方法非常耗費人力與時間，因此為了開發有效率地大量收集方式，本研究利用市售的小型昆蟲羽化裝置為收集裝置的原型，測試此裝置有無紙條橋接、橋接材質及光源對於咖啡果小蠹成蟲的收集效果。試驗結果顯示，最有效率的收集方式，為於裝置中放置一紙條使其連結上方的收集盒與下方放置受害咖啡果實的底盒，並利用鋁箔紙包覆底盒及連接兩端的漏斗裝置，使光源集中來自上方；而以不同材質之紙條 (濾紙、西卡紙與影印紙) 作為橋接紙張的收集效果，則無顯著差異。綜合上述試驗，本研究所描述的收集裝置及方法，可有效率地自受害咖啡果實中收集大量咖啡果小蠹成蟲，未來可應用於需要大量咖啡果小蠹成蟲活體之研究。

**關鍵詞**：咖啡果小蠹、*Hypothenemus hampei*、收集方法。

投稿日期：2018 年 11 月 28 日；接受日期：2019 年 3 月 14 日。

[*] 通訊作者：yupingliang@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 嘉義市。
[2] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系研究助理。台灣 嘉義市。

# Editorial Board

## Editor-in-Chief

Yang, Chwen-Ming
*Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute*

## Editors

Ann, Pao-Jen
*Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute*
Chang, Ruey-Jang
*Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute*
Chang, Yung-Ho
*Department of Food and Nutrition, Providence University*
Chen, Chien-Chung
*Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute*
Chen, Chiling
*Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute*
Chen, Chung-Li
*Department of Agronomy, National Chung Hsing University*
Chen, Iou-Zen
*Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University*
Chen, Suming
*Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University*
Chen, Yu-Hui
*Department of Agricultural Economics, National Taiwan University*
Chien, Li-Hsien
*Department of Applied Economics, National Chung Hsing University*
Chung, Wen-Hsin
*Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University*
Do, Yi-Yin
*Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University*
Hou, Feng-Nan
*Department of Entomology, National Chung Hsing University*
Huang, Chao-Chia
*Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute*
Huang, Jenn-Wen
*Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University*
Huang, Pung-Ling
*Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University*
Huang, Yuh-Ming
*Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University*
Juang, Kai-Wei
*Department of Agronomy, National Chiayi University*
Kao, Ching-Huei
*Department of Agronomy, National Taiwan University*
Ko, Chiun-Cheng
*Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University*
Ku, Hsin-Mei
*Department of Agronomy, National Chung Hsing University*
Kuo, Bau-Jeng
*Department of Agronomy, National Chung Hsing University*
Lin, Huey-Ling
*Department of Horticulture, National Chung Hsing University*
Lin, Yann-Rong
*Department of Agronomy, National Taiwan University*
Liu, Li-Yu
*Department of Agronomy, National Taiwan University*
Lu, Hsiu-Ying
*Miaoli District Agricultural Research and Extension Station*
Lu, Kuang-Hui
*Department of Entomology, National Chung Hsing University*
Shen, Wei-Chiang
*Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University*
Tsay, Jyh-Rong
*Taiwan Agricultural Research Institute*
Tseng, Menq-Jiau
*Department of Horticulture, National Chung Hsing University*
Tzou, Yu-Min
*Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University*
Wang, Chan-Sen
*Department of Agronomy, National Chung Hsing University*
Wang, Shu-Jen
*Department of Agronomy, National Taiwan University*
Wu, Wen-Jer
*Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University*
Yang, Jeng-Tze
*Department of Entomology, National Chung Hsing University*
Yen, Gow-Chin
*Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University*

## Editorial Assistants

Wang, Li-Jung
*Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research*
Wang, Zi-Yu
*Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research*

## Consultant to Editorial Office

Chen, Lit-Fu
*Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute*
Wu, Yi-Yan
*Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute*

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 68 No. 3 September 30, 2019

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture
Publisher Hsueh-Shih Lin
Editor-in-Chief Chwen-Ming Yang
Address No.189, Zhongzheng Rd., Wufeng Dist., Taichung City 41362, Taiwan, ROC
Website http://www.tari.gov.tw; E-mail: jtar@tari.gov.tw; Tel: +886-4-2331-7236
Submission http://www.ipress.tw/J0042

Press Ainosco Press
Address 18F, No.80, Sec.1, Chenggong Rd., Yonghe Dist., New Taipei City 23452, Taiwan, ROC
Tel +886-2-2926-6006
E-mail press@airiti.com

Price NT$ 175 (per copy)
Distributor
1. GB Books / 1F., No.209, Songjiang Rd., Taipei City 10485, Taiwan, ROC
   GB Website: http://www.govbooks.com.tw; Tel: +886-2-2518-0207
2. Wunan Books / No.6, Zhongshan Rd., Taichung City 40042, Taiwan, ROC
   Tel: +886-4-2226-0330